

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

COMPRÉHENSION ET GÉNÉRALISATION DU MÉCANISME  
DE PROTECTION DE PEPTIDES HORMONAUX PAR  
CONJUGAISON À L'ALBUMINE

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR  
MICHÈLE PARISIEN

JANVIER 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Mon tout premier remerciement est dédié au Dr. Serge St-Pierre, un directeur de maîtrise et de doctorat exceptionnel, qui m'a guidé et soutenu tout au long des six dernières années et sans qui je n'aurais pu réaliser cette recherche doctorale.

Un autre très gros remerciement au Dr. Dominique Bridon de Conjuchem Inc., qui m'a accueilli au sein de son équipe, qui m'a conseillé et surtout soutenu dans mes recherches. Un très gros merci pour ta considération, ton enseignement et ta générosité qui m'ont permis de m'épanouir à travers ce projet de recherche.

Je dois cependant ajouter que la réalisation et la rédaction de chacune des pages de cette thèse n'a pu être possible que grâce à la contribution de mes amis du laboratoire de Conjuchem et plus spécialement à Karen Thibaudeau, Isabelle Pellerin, Geneviève Nault, Marie Leclerc, Patricia Liscourt et tous les autres. Merci pour votre belle amitié et votre support.

Je sais que j'oublie des gens. Mais un fait est certain. Bien que je demeure le principal artisan de cette thèse de doctorat, je ne peux pas ignorer que la réalisation de celle-ci n'aurait jamais été possible sans la contribution de tous les membres de ma famille et surtout de Martin. Ton support, ton encouragement et ton dévouement m'ont donné l'énergie de terminer cet énorme parcours de ma vie. Merci beaucoup.

Un merci tout spécial à mon petit Alexis, la merveille de ma vie, conçu et né lors de la réalisation et la rédaction de cette thèse.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xii
LISTE DES SYMBOLES .....	xv
RÉSUMÉ .....	xvi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Diabète de type II .....	1
1.1.1 La résistance à l'insuline .....	2
1.1.2 La dysfonction des cellules $\beta$ pancréatiques .....	5
1.1.3 Perspectives thérapeutiques .....	6
1.2 Le GLP-1 ( <i>glucagon-like peptide 1</i> ) et l'exendin-4 .....	9
1.2.1 Les fonctions biologiques et thérapeutiques du GLP-1 .....	9
1.2.2 L'exendin-4 .....	13
1.3 Le récepteur et les voies de signalisation du GLP-1 et de l'exendin-4 .....	14
1.3.1 La voie de la protéine kinase A .....	15
1.3.2 La voie de la phospholipase C .....	16
1.3.3 La voie des MAP ( <i>mitogen activated protein</i> ) kinases (MAPK) ..	16
1.4 Le catabolisme du GLP-1 et de l'exendin-4 .....	18
1.4.1 L'élimination du GLP-1 et de l'exendin-4 .....	18
1.4.2 La dégradation du GLP-1 et de l'exendin-4 .....	19
1.5 La technologie des DAC <sup>TM</sup> .....	20
1.5.1 La conjugaison à l'albumine .....	21
1.6 La technologie des PC-DAC <sup>TM</sup> .....	22



1.7	Albumine et immunogénicité .....	25
1.7.1	Immunogénicité des protéines thérapeutiques .....	25
1.7.2	La conjugaison à l'albumine une solution à l'immunogénicité .....	26
1.8	Objectifs .....	28

## CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE .....	29
2.1 Synthèse et purification peptidiques .....	29
2.1.1 Synthèse et purification des peptides DAC <sup>TM</sup> .....	30
2.1.2 Synthèse, purification et caractérisation des conjugués pré-formés .....	31
2.2 Test oral de tolérance au glucose (OGTT) .....	34
2.3 Contrôle de la glycémie par un régime d'injections multiples .....	35
2.4 Évaluation de la production d'insuline .....	36
2.5 Évaluation de l'efficacité de liaison au récepteur .....	36
2.6 Pharmacocinétique <i>In Vivo</i> .....	37
2.7 Dosage immunoradioactif (RIA) .....	37
2.8 Électrophorèse et Western Blot .....	38
2.9 Évaluation de l'immunogénicité .....	39
2.10 Dosage immunoenzymatique (EIA) .....	40
2.11 Analyse des résultats .....	43

## CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	45
3.1 Synthèse des différents peptides et dérivés à l'étude .....	45
3.2 Purification et caractérisation des conjugués pré-formés (PC) .....	45
3.3 Test oral de tolérance au glucose (OGTT) chez la souris diabétique .....	49
3.3.1 Profil pharmacodynamique après injection d'une seule dose .....	49
3.3.2 Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration .....	62

3.4	Effet d'une seule injection d'exendin-4 et de ses dérivés (DAC <sup>TM</sup> et PC) sur la glycémie et la consommation d'eau et de nourriture des souris diabétiques .....	66
3.5	Effet d'un régime d'injections multiples d'exendin-4 et de ses dérivés (DAC <sup>TM</sup> et PC) sur la glycémie et la consommation d'eau et de nourriture des souris diabétiques .....	69
3.6	Effet global de l'exendin-4 et de ses dérivés (DAC <sup>TM</sup> et PC) sur la prise de poids et la concentration d'insuline plasmatique des souris diabétiques .....	76
3.7	Détermination du potentiel de liaison au récepteur du GLP-1, de l'exendin-4 et de ses dérivés .....	76
3.8	Étude de pharmacocinétique .....	79
3.8.1	Profil pharmacocinétique des DAC <sup>TM</sup> GLP-1 .....	79
3.8.2	Profil pharmacocinétique de l'exendin-4 et des DAC <sup>TM</sup> exendin-4 .....	82
3.8.3	Profil pharmacocinétique des dérivés de l'exendin-4 .....	82
3.9	Analyse Western Blot de l'étude de pharmacocinétique .....	85
3.10	Évaluation de l'immunogénicité des dérivés de l'exendin-4 chez le rat Sprague Dawley .....	90
3.10.1	Phase thérapeutique .....	90
3.10.2	Première phase d'immunisation .....	92
3.10.3	Deuxième phase d'immunisation .....	99
CHAPITRE IV		
CONCLUSION .....		118
BIBLIOGRAPHIE .....		130

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Voies de signalisation du récepteur de l'insuline .....	3
1.2 Sites d'action des thérapies pharmacologiques .....	8
1.3 Sommaire des actions physiologiques du GLP-1 .....	10
1.4 Principales voies de signalisation du GLP-1 .....	17
1.5 Représentation de l'interaction entre le DAC <sup>TM</sup> et l'albumine .....	23
1.6 Structure d'un complexe d'albumine bioconjugué à un peptide bioactif ..	24
2.1 Schéma général des étapes d'une synthèse peptidique .....	32
2.2 Schéma détaillé des injections et des prélèvements de la phase thérapeutique de l'étude d'immunogénicité .....	41
2.3 Schéma détaillé des injections et des prélèvements de la première phase de l'étude d'immunogénicité .....	42
2.4 Illustration du dosage immunoenzymatique (EIA) dans la détermination du titre d'anticorps des études d'immunogénicité .....	44
3.1 Code d'identification et structure des peptides et des dérivés à l'étude ....	46
3.2 Profil de purification des conjugués pré-formés par électrophorèse .....	48
3.3 Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine de rat avant sa purification sur la colonne butyle .....	50
3.4 Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine humaine avant sa purification sur la colonne butyle .....	51

3.5	Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine de rat après sa purification sur la colonne butyle .....	54
3.6	Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine humaine après sa purification sur la colonne butyle .....	55
3.7	Analyse par Western Blot des échantillons d'albumine de rat, d'albumine humaine et des conjugués pré-formés avec le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 avant et après purification sur la colonne butyle .....	56
3.8	Test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique injectée avec l'exendin-4 libre, le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 short linker et le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 long linker 5 minutes pré-OGTT .....	58
3.9	Test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique injectée avec l'exendin-4 libre, le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 short linker et le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 long linker 6 heures pré-OGTT .....	59
3.10	Test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique injectée avec le DAC <sup>TM</sup> GLP-1 short linker et le DAC <sup>TM</sup> GLP-1 long linker 5 minutes et 6 heures pré-OGTT .....	60
3.11	Test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique injectée avec l'exendin-4 libre 5 minutes, 12 heures et 24 heures pré-OGTT .....	61
3.12	Test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique injectée avec le DAC <sup>TM</sup> GLP-1(dAla <sup>8</sup> ) 5 minutes, 12 heures et 24 heures pré-OGTT ...	63
3.13	Test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique injectée avec le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 5 minutes, 12 heures et 24 heures pré-OGTT .....	64
3.14	Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration chez la souris diabétique injectée avec le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 5 minutes pré-OGTT .....	65
3.15	Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration chez la souris diabétique injectée avec le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 12 heures pré-OGTT .....	67
3.16	Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration chez la souris diabétique injectée avec le DAC <sup>TM</sup> exendin-4 24 heures pré-OGTT .....	68
3.17	Profil du taux de glucose sanguin chez les souris diabétiques suivant une seule injection .....	69

3.18	Consommation de nourriture et d'eau chez les souris diabétiques suivant une seule injection .....	71
3.19	Profil du taux de glucose sanguin chez les souris diabétiques suivant un protocole d'injections multiples .....	73
3.20	Profil du taux de glucose sanguin de 0 à 48 heures chez les souris diabétiques suivant un protocole d'injections multiples .....	74
3.21	Profil du taux de glucose sanguin de 48 à 96 heures chez les souris diabétiques suivant un protocole d'injections multiples .....	75
3.22	Profil du taux de glucose sanguin de 96 à 168 heures chez les souris diabétiques suivant un protocole d'injections multiples .....	77
3.23	Consommation de nourriture et d'eau chez les souris diabétiques suivant un protocole d'injections multiples .....	78
3.24	Profil de la prise de poids des souris diabétiques pendant la durée entière de l'expérimentation avec une seule injection et le protocole d'injections multiples .....	79
3.25	Détermination de la concentration plasmatique d'insuline des échantillons sanguins prélevés chez les souris diabétiques à la fin de la partie expérimentale du protocole d'injections multiples .....	81
3.26	Détermination du potentiel de liaison au récepteur des cellules CHO .....	82
3.27	Profil pharmacocinétique des composés CJC-1050 et CJC-1051 injectés par voie intraveineuse et sous-cutanée chez le rat Sprague Dawley .....	84
3.28	Profil pharmacocinétique des composés CJC-1132, CJC-1133 et CJC-1134 injectés par voie intraveineuse et sous-cutanée chez le rat Sprague Dawley .....	86
3.29	Profil pharmacocinétique des composés CJC-1134, CJC-1730, CJC1249 et CJC-1734 injectés par voie intraveineuse et sous-cutanée chez le rat Sprague Dawley .....	87
3.30	Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés avec le composé CJC-1134 .....	89

3.31	Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés avec le composé CJC-1730 .....	90
3.32	Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés avec le composé CJC-1249 .....	91
3.33	Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés avec le composé CJC-1734 .....	92
3.34	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique des rats Sprague Dawley injectés avec RSA et HSA .....	94
3.35	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique des rats Sprague Dawley injectés avec RSA:1134 et HSA:1134 .....	96
3.36	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique des rats Sprague Dawley injectés avec CJC-1132 et CJC-1134 .....	97
3.37	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique .....	98
3.38	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique .....	99
3.39	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec RSA et HSA .....	100
3.40	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec RSA:1134 et HSA:1134 .....	102
3.41	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec CJC-1132 et CJC-1134 .....	103

3.42	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation .....	104
3.43	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation .....	105
3.44	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 et du RSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation .....	106
3.45	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du RSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation .....	107
3.46	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1132 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation .....	108
3.47	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1132 et CJCJ-1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation .....	109
3.48	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation .....	110
3.49	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec du RSA:1707 et du HSA:1707 .....	112
3.50	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec deux doses de CJC-1707 .....	113
3.51	Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1132 à une dose de 5 µg .....	114
3.52	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du RSA:1707 et du HSA:1707 lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation .....	116

3.53	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1707 lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation .....	117
3.54	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1707 à une dose de 50 µg lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation .....	118
3.55	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1707 à une dose de 5 µg, lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation .....	119
3.56	Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1132 à une dose de 5 µg lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation .....	120



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
AE EA	acide aminoéthoxyéthoxyacétique
Aloc	allyloxycarbonyl
AMPc	3'5' adénosine monophosphate cyclique
ANP	atrial natriuretic peptide
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BCA	acide bicinchoninique
BSA	albumine sérique bovine
CEL	carboxyl ester lipase
CHO	chinese hamster ovarian
CREB	cyclic AMP response element binding protein
DAC	complexe d'affinité pharmacothérapeutique
DCM	dichlorométhane
DG	diacylglycérol
DIEA	N,N,-diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide

DP IV	dipeptidyl peptidase IV
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EIA	essai immunoenzymatique
FBS	sérum bovin foetal
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbonyl
GDP	guanosine diphosphate
GIP	glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GLP-2	glucagon-like peptide 2
GRF	growth hormone releasing factor
GTP	guanosine triphosphate
HBTU	O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate
HOAc	acide acétique
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
HSA	albumine sérique humaine
ICV	intra-cérébroventriculaire
IDX-1	islet-duodenum homeobox-1
IP	intrapéritonéal
IP3	inositol triphosphate
IV	intraveineux

LC/MS	chromatographie liquide/spectrométrie de masse
MPA	acide 3-maléimidopropionique
NEP	neutral endopeptidase
NIDDM	diabète non insulino-dépendant mellitus
NMM	n-méthylmorpholine
OGTT	test oral de tolérance au glucose
OPD	o-phenylenediamine
PBS	tampon sodiumphosphate
PC	prohormone convertase
PC	conjugué pré-formé
PC-DAC	conjugué préformé-complexe d'affinité pharmacothérapeutique
Pd (PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	tetrakis (triphénylphosphine) palladium (0)
PEG	polyéthylène glycol
PLC	phospholipase C
RIA	essai radioimmunologique
RSA	albumine sérique de rat
SC	sous-cutané
SD	Sprague Dawley
SEM	erreur standard de la moyenne
SNC	système nerveux central
SOD	superoxide dismutase
TFA	acide trifluoroacétique

TYR      tyrosine kinase

## LISTE DES SYMBOLES

g	gramme
min	minute
mg	milligramme
ml	millilitre
mM	millimolaire
nmol	nanomole
°C	degré Celsius
rpm	tour par minute
ug	microgramme

## RÉSUMÉ

Le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) et surtout l'exendin-4 sont de puissantes hormones insulinothropiques dépendantes du glucose dont le potentiel pourrait être grandement exploité dans le traitement des personnes atteintes du diabète de type II (diabète non-insulinodépendant mellitus). Le GLP-1 est sécrété par les cellules intestinales de type L, à partir du gène du préproglucagon. Cependant, il est rapidement dégradé dans la circulation par des enzymes protéolytiques, particulièrement par une endopeptidase, la dipeptidyl peptidase IV (DP IV), qui l'inactive complètement. Par conséquent, l'utilisation thérapeutique du GLP-1 est limitée. L'exendin-4, un agoniste du récepteur du GLP-1, est sécrété par les glandes salivaires du lézard *Gila Monster* et possède un potentiel biologique supérieur au GLP-1 grâce à sa stabilité accrue en circulation. Une plate-forme technologique telle la conjugaison à l'albumine (DAC™ et PC-DAC™) pourrait améliorer le profil pharmacodynamique et pharmacocinétique de ces molécules thérapeutiques natives en augmentant leur stabilité face à la dégradation enzymatique et en diminuant le potentiel immunogénique de molécules exogènes, tel l'exendin-4. La présente étude vise donc à mieux comprendre, à analyser et à évaluer le pouvoir de protection que la conjugaison à l'albumine confère aux peptides hormonaux et, plus spécialement, à l'exendin-4, afin de mettre au point un agent thérapeutique plus puissant et plus stable qui servirait à traiter le diabète de type 2. Une série d'analogues du GLP-1 et de l'exendin-4 ont été synthétisés sous forme de DAC™ et les dérivés résultants ont été bioconjugués *in vivo* ou *in vitro* à la cystéine en position 34 de l'albumine, soit de rat (RSA) ou humaine (HSA). L'expérimentation *in vivo* chez la souris diabétique a permis d'évaluer le potentiel insulinothropique des différents dérivés à l'étude. L'activité biologique et la stabilité des DAC™ de l'exendin-4 lorsque bioconjugués *in vivo* sont de beaucoup supérieures à l'exendin-4 native et l'effet peut être observé jusqu'à 24 heures suivant le test oral de tolérance au glucose. Le profil pharmacocinétique démontre bien cette stabilité conférée par la conjugaison à l'albumine. Lorsque les peptides DAC™ sont conjugués *in vitro* à l'albumine, le potentiel insulinothropique est de beaucoup supérieur à celui des DAC™ seuls et des molécules natives évidemment. L'évaluation de l'immunogénicité de l'exendin-4 chez le rat Sprague Dawley a permis de démontrer que la conjugaison à l'albumine de rat diminuait le potentiel immunogénique de cette molécule lors de la phase thérapeutique et de la première phase d'immunisation. Ces résultats tendent donc à démontrer l'efficacité de la conjugaison à l'albumine de manière *in vitro*, plus que *in vivo* afin d'augmenter l'activité biologique et la stabilité en circulation des molécules thérapeutiques natives. La poursuite de cette étude dans le but de mieux comprendre le mécanisme et les propriétés de la conjugaison à l'albumine devrait permettre de

mettre au point non seulement un agent thérapeutique efficace pour traiter le diabète de type 2, mais aussi de mettre au point plusieurs autres agents thérapeutiques qui pourraient profiter de cette technologie.

Mots clés : diabète, exendin-4, GLP-1, albumine, conjugaison.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le diabète de type 2

Le diabète est un problème de santé global qui représente un des défis médicaux les plus importants du XXI<sup>e</sup> siècle. Son impact incontournable sur la santé, la qualité et l'espérance de vie des individus préoccupe déjà tous les systèmes de santé des pays occidentaux. On estime à environ 21 millions le nombre d'hommes, de femmes et d'enfants aux États-Unis qui sont atteints du diabète (90% du diabète de type 2 et 10% du diabète de type 1), ce qui représente environ 7% de la population. Les formes les plus communes de diabètes sont le diabète de type 1 ordinaire, qui résulte d'une réaction auto-immunitaire et affecte surtout la population juvénile, et le diabète de type 2, associé principalement à l'obésité (DeFronzo et *al*, 1992; DeFronzo, 2004).

La croissance du nombre de cas de diabète non-insulinodépendant (NIDDM) ou de type 2 est donc particulièrement inquiétante. À l'échelle mondiale, on estime que cette maladie touche déjà 194 millions d'individus, et que ce nombre pourrait atteindre 333 millions d'ici vingt ans (King et *al*, 1998; International Diabetes Federation). Le risque de développer le diabète de type 2 est lié de près à des facteurs tels l'obésité, l'âge, la mauvaise alimentation et la sédentarité (Mokdad et *al*, 2001). Touchant d'abord les individus âgés de 40 ans et plus, le diabète de type 2 a connu plus récemment une croissance fulgurante chez les adolescents et les jeunes adultes, ce qui en fait un phénomène plutôt alarmant. Basé sur des statistiques récentes, il a même été prédit que, parmi les enfants nés à partir de l'an 2000, 1 sur 3 serait susceptible de souffrir du diabète à un certain moment dans sa vie (Marcovecchio et *al*, 2005; Narayan et *al*, 2003).



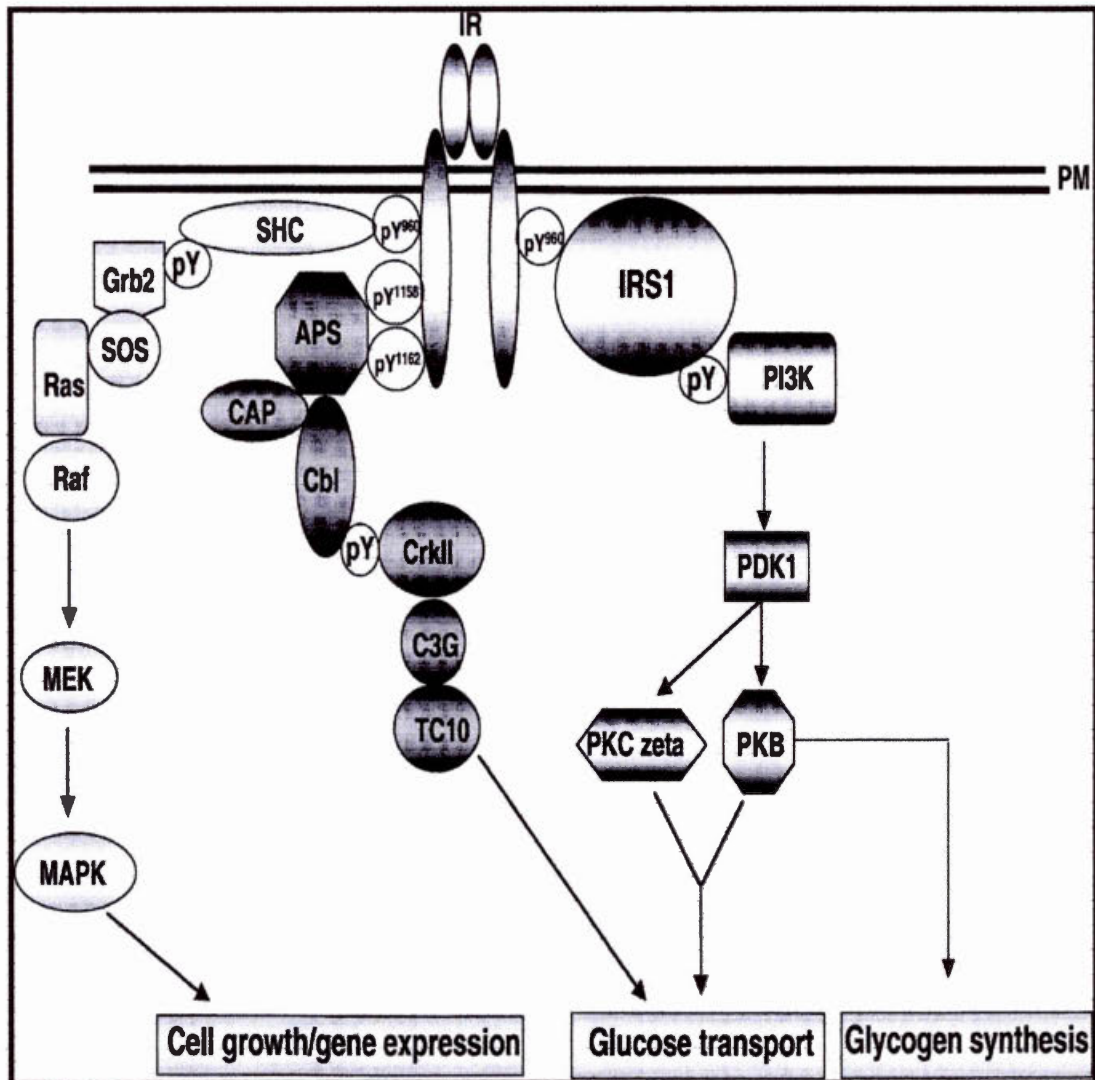
Le diabète est caractérisé par un niveau anormalement élevé du taux de glucose sanguin. Quand le taux de glucose sanguin augmente, particulièrement après un repas, il y a stimulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. L'insuline stimule les muscles, les adipocytes et le foie afin de métaboliser le glucose, causant ainsi une diminution du taux de glucose sanguin à un niveau normal. Chez les individus atteints du diabète, le niveau de glucose sanguin reste élevé. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'insuline n'est pas produite du tout ou en quantité insuffisante, ou encore qu'elle n'est pas aussi efficace qu'elle devrait l'être.

Le diabète de type 2 est caractérisé par : (i) une résistance à l'insuline impliquant les muscles, le foie et les adipocytes; (ii) une dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques entraînant une déficience au niveau de la sécrétion d'insuline; et (iii) une défaillance au niveau de la prise du glucose par les tissus splanchniques (le foie et les intestins) (DeFronzo, 2004; Gerich, 1998).

### 1.1.1 La résistance à l'insuline

De façon normale, l'insuline en circulation rejoint rapidement les tissus cibles et interagit avec son récepteur. Le récepteur à l'insuline est un récepteur transmembranaire TYR (tyrosine kinase) qui est exprimé sous forme d'un tétramère de configuration  $\alpha_2\beta_2$ . La liaison de l'insuline à une région spécifique de la sous-unité  $\alpha$  permet un changement de configuration rapide du récepteur entraînant une cascade d'autophosphorylation des résidus tyrosine spécifiques de la région intracellulaire de la sous-unité  $\beta$ . De cette autophosphorylation résulte l'activation de la tyrosine kinase du récepteur. La liaison de l'insuline permet l'initiation de deux voies de signalisation distinctes, soit l'activation de Ras (facteur de croissance et expression génique) et l'activation de la protéine kinase B (transport du glucose et synthèse du glycogène) (figure 1.1) (LeRoith et Zick, 2001; Lodish et *al*, 2000).

L'insuline est l'exemple typique d'une hormone capable d'initier plusieurs voies de signalisation qui induisent des réponses cellulaires immédiates et à long terme.



**Figure 1.1** Voies de signalisation du récepteur de l'insuline. L'insuline interagit avec la sous-unité  $\alpha$  de son récepteur, engendrant une augmentation de l'autophosphorylation et de l'activité de la tyrosine kinase de la sous-unité  $\beta$ . L'activation de Ras et de la cascade des MAP kinases est impliquée dans la croissance cellulaire et la régulation de l'expression génique. L'activation de la cascade de la protéine kinase B (PI3K) est impliquée dans le transport du glucose et la synthèse du glycogène. (Tiré de Le Marchand-Brustel, 2003)

Les effets immédiats de l'insuline incluent une augmentation de la prise de glucose sanguin par les cellules musculaires et adipeuses et la modulation de l'activité de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme glucidique. Ces effets se produisent en moins de quelques minutes et aucune synthèse de nouvelles protéines n'est requise. Une exposition continue à l'insuline engendre des effets à plus long terme, incluant une augmentation de l'expression des enzymes du foie et des adipocytes qui synthétisent, respectivement, le glycogène et les triacylglycérols. L'insuline fait aussi fonction de facteur de croissance et régularise l'expression génique pour plusieurs cellules (Lodish *et al*, 2000).

La résistance à l'insuline est un état pathologique commun dans lequel les cellules cibles ne répondent plus à un niveau normal d'insuline en circulation. Cet état est fréquemment associé à de nombreuses maladies, telles des infections chroniques, l'obésité et le diabète de type 2 (LeRoith et Zick, 2001). Le maintien de l'homéostasie du glucose dans tout le corps dépend d'une réponse normale de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas et d'une sensibilité normale des tissus aux effets indépendants de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie pour augmenter la prise du glucose. Les effets combinés de l'insuline et de l'hyperglycémie permettant l'élimination du glucose dépendent de trois mécanismes intimement reliés: (i) la suppression de la production endogène (principalement hépatique) de glucose, (ii) la stimulation de la prise de glucose par le foie et le système gastro-intestinal et (iii) la stimulation de la prise de glucose par les tissus périphériques, plus spécialement les muscles (DeFronzo, 1997). La résistance à l'insuline peut être causée par une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline, par un dérèglement des transporteurs du glucose ou par une action déficiente d'enzymes intracellulaires, telles la glycogène synthétase et la pyruvate déshydrogénase. D'autres mécanismes pourraient aussi expliquer la résistance à l'insuline, incluant une augmentation de l'oxydation des lipides ou une altération de la densité des capillaires et du flux sanguin au niveau des muscles squelettiques.

L'altération du transport d'insuline à travers l'endothélium vasculaire, ou une augmentation du niveau d'amyline et du gène relié à la calcitonine pourraient également être considérés (DeFronzo et *al*, 1992).

### 1.1.2 La dysfonction des cellules $\beta$ pancréatiques

Comme conséquence à la résistance à l'insuline, les cellules  $\beta$  pancréatiques devraient exercer une certaine compensation en sécrétant plus d'insuline, afin de normaliser le taux de glucose sanguin. Cependant, les personnes atteintes du diabète de type 2 sont caractérisées par une dysfonction au niveau de ces cellules. Par contre, il n'est pas tout à fait clair si cette dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques résulte d'une diminution du nombre de cellules (soit par une augmentation de la destruction ou une diminution de la production) ou d'une déficience au niveau du fonctionnement de ces dernières (Hattersley, 2006).

Plusieurs phénomènes physiologiques pourraient être impliqués dans le processus de détérioration des cellules  $\beta$  pancréatiques ou, encore, de leur incapacité à stimuler la sécrétion d'insuline pour permettre de rétablir l'homéostasie au niveau du glucose sanguin. L'hyperglycémie et l'hyperlipidémie chronique, que l'on nomme plus communément la glucotoxicité et la lipotoxicité, peuvent causer des dommages importants au niveau des fonctions des cellules  $\beta$ . Avec le temps, ces deux phénomènes contribuent à la détérioration progressive de l'homéostasie du glucose, caractéristique du diabète de type 2. Le mécanisme du phénomène de glucotoxicité implique plusieurs facteurs de transcription, ainsi que la génération de stress oxydatif chronique. Le phénomène de lipotoxicité est probablement engendré par l'accumulation d'un signal cytosolique provenant de la voie de signalisation de l'estérification des acides gras (Poitout et Robertson, 2002; Robertson et *al*, 2004; Wright et *al*, 2006). Il a été démontré entre autre que la présence d'un dépôt de IAPP (*islet-amyloid polypeptide*), aussi connu sous le nom d'amyline, sur les cellules  $\beta$  pancréatiques, pouvait causer une augmentation du processus apoptotique, ce qui

engendrerait une diminution de la masse des cellules  $\beta$  (Porte et Kahn, 2001; Zhang et al, 2003).

Récemment, la génétique a permis d'améliorer notre compréhension de la base moléculaire de la dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques. En effet, une étude récente a démontré qu'une mutation au niveau du gène codant pour la CEL (*carboxyl ester lipase*) provoque la dysfonction des cellules  $\beta$  et l'apparition du diabète. Comme ce gène est exprimé de manière exocrine et non endocrine au pancréas, son identification pourrait remettre en question certaines idées préconçues relativement aux origines de la dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques, qui caractérise le diabète de type 2 (Hattersley, 2006; Raeder et al, 2006).

### 1.1.3 Perspectives thérapeutiques

En réponse au problème d'envergure que représente la croissance du nombre de personnes atteintes du diabète de type 2, les efforts ont augmenté considérablement au cours des dernières années afin de concevoir et de développer de nouveaux agents thérapeutiques efficaces et spécifiques à cette pathologie. Ces efforts ont permis récemment la mise au point de nouveaux traitements, présentement en études cliniques, et qui seront disponibles aux patients d'ici quelques années.

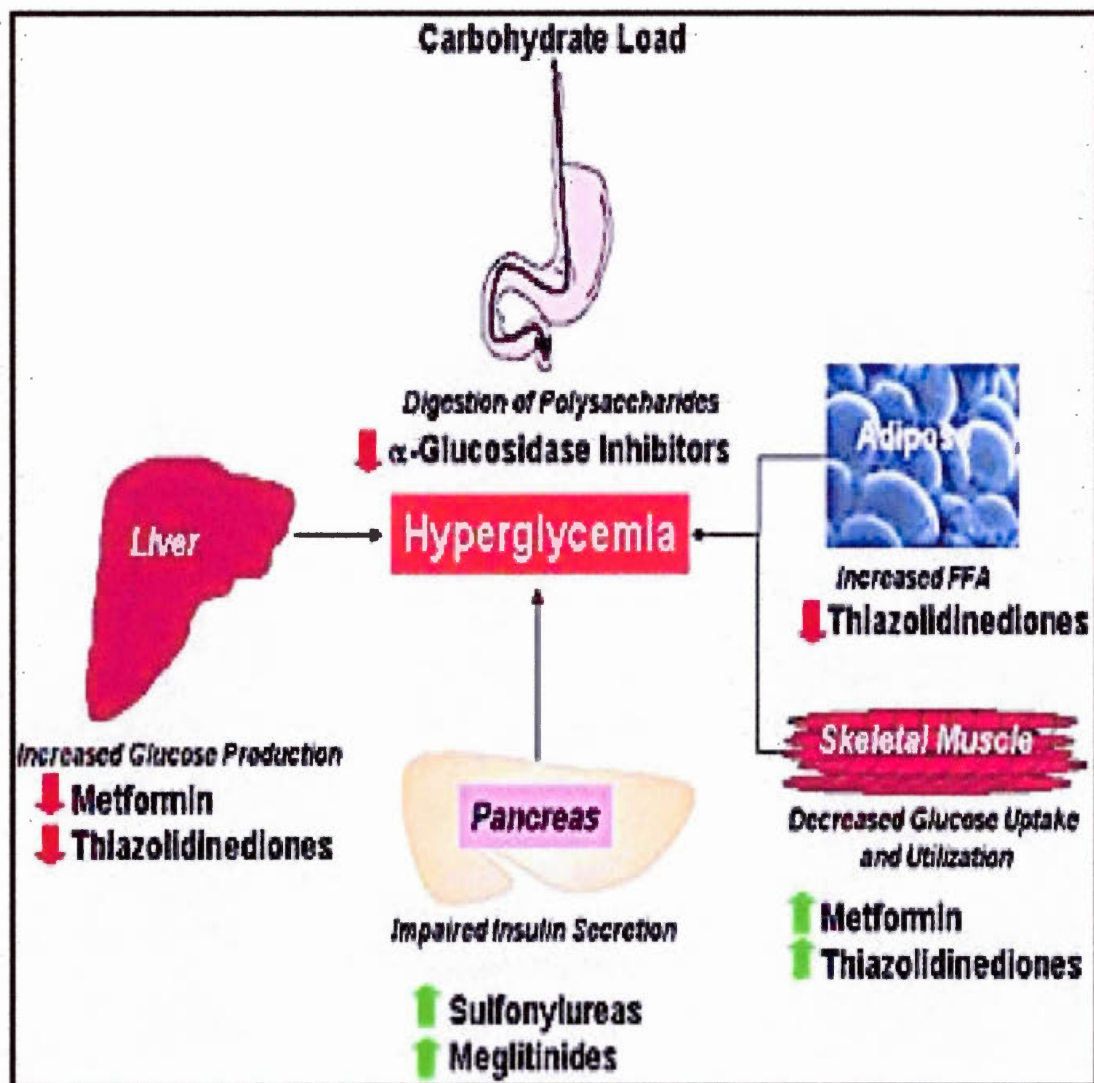
Présentement, mis à part le traitement à l'insuline, il existe cinq classes d'agents pharmacologiques oraux disponibles pour traiter le diabète de type 2: les médicaments de type sulfonylurés, les méglitinides, le Metformin, les thiazolidinediones et les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase. Les médicaments de type sulfonylurés sont des sécrétagogues de l'insuline, puisqu'ils contrôlent le taux de glucose en stimulant directement la première phase de sécrétion de l'insuline au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques. Similairement aux sulfonylurés, les méglitinides sont aussi des sécrétagogues de l'insuline et stimulent aussi sa première phase de sécrétion, mais en présence de glucose seulement, ce qui diminue chez le patient les risques d'hypoglycémie. Le Metformin, l'agent oral le plus couramment prescrit

pour le traitement du diabète de type 2, agit au niveau de la suppression de la production basale de glucose par le foie, ce qui permet d'abaisser le taux de glucose en circulation. Le Metformin ne stimule pas la sécrétion d'insuline, au contraire, il réduit le taux d'insuline en circulation et améliore le métabolisme du glucose stimulé par l'insuline. L'effet premier des agents de la classe des thiazolidinediones est la réduction de la résistance à l'insuline et l'amélioration de la sensibilité des tissus à l'insuline, ce qui résulte en une diminution du taux de glucose, d'insuline et d'acide gras libres en circulation. Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase sont des composés hypoglycémisants qui fonctionnent en bloquant la dégradation des hydrates de carbone complexes au niveau du petit intestin. Ce sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles de l' $\alpha$ -amylase pancréatique et des enzymes de l' $\alpha$ -glucosidase hydrolase liés à la membrane intestinale (figure 1.2) (DeFronzo, 2000; Evans et Krentz, 1999; Evans et Rushakoff, 2002).

Toutefois, l'ensemble de ces traitements occasionne des effets secondaires indésirables, plus ou moins importants selon la classe du médicament. Souvent, le traitement du diabète de type 2 avec ces agents pharmacologiques doit faire l'objet d'une thérapie combinée à l'insuline pour optimiser le contrôle de la glycémie. Malgré la disponibilité d'analogues de l'insuline qui permettent un meilleur contrôle du taux de glucose sanguin tout en diminuant les risques d'hypoglycémie, il existe un besoin immédiat pour la mise au point de nouveaux agents thérapeutiques contre le diabète de type 2 (Evans et Rushakoff, 2002). Ainsi, plusieurs nouveaux traitements sont présentement en développement et en évaluation clinique, tels des agonistes du GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) (exenatide, liraglutide), des inhibiteurs de la *dipeptidyl peptidase IV* (NVP DPP728) et des analogues de l'amyline (pramlintide). Tout récemment, la FDA (*Food and Drug Administration*) a approuvé la mise sur le marché de l'exenatide (Byetta™; Amylin Pharmaceuticals, Inc.) et de la pramlintide (Symlin®; Amylin Pharmaceuticals, Inc.) (Earl, 2005). On s'attend à ce que ces nouveaux agents aient un effet bénéfique sur les divers processus impliqués dans la pathophysiologie du diabète de type 2, tels la déficience au niveau de la sécrétion

d'insuline, l'augmentation de la production de glucose par la voie hépatique et la résistance à l'insuline des tissus périphériques, mais plus efficace et sécuritaire, grâce au plus haut degré de sélectivité de leurs cibles moléculaires respectives. De plus, les nouvelles informations relatives à la biochimie, à la biologie cellulaire, à la pathophysiologie de la maladie ainsi que l'émergence de la génomique et de la protéomique amènent d'autres opportunités intéressantes pour l'identification de cibles moléculaires inédites qui permettraient de développer de nouvelles générations d'agents thérapeutiques efficaces (Brower, 2001).





**Figure 1.2** Sites d'action des thérapies pharmacologiques présentement administrées pour le traitement du diabète de type 2. Les inhibiteurs de  $\alpha$ -glucosidase inhibent la dégradation des hydrates de carbone au niveau de l'intestin. Les sulfonylurés et les méglitinides stimulent la sécrétion d'insuline. Le Metformin et les thiazolidinediones inhibent la production de glucose au niveau du foie, augmentent la prise du glucose par les tissus squelettiques et diminuent le taux d'acide gras en circulation. (Tiré de Evans et Rushakoff, 2002)



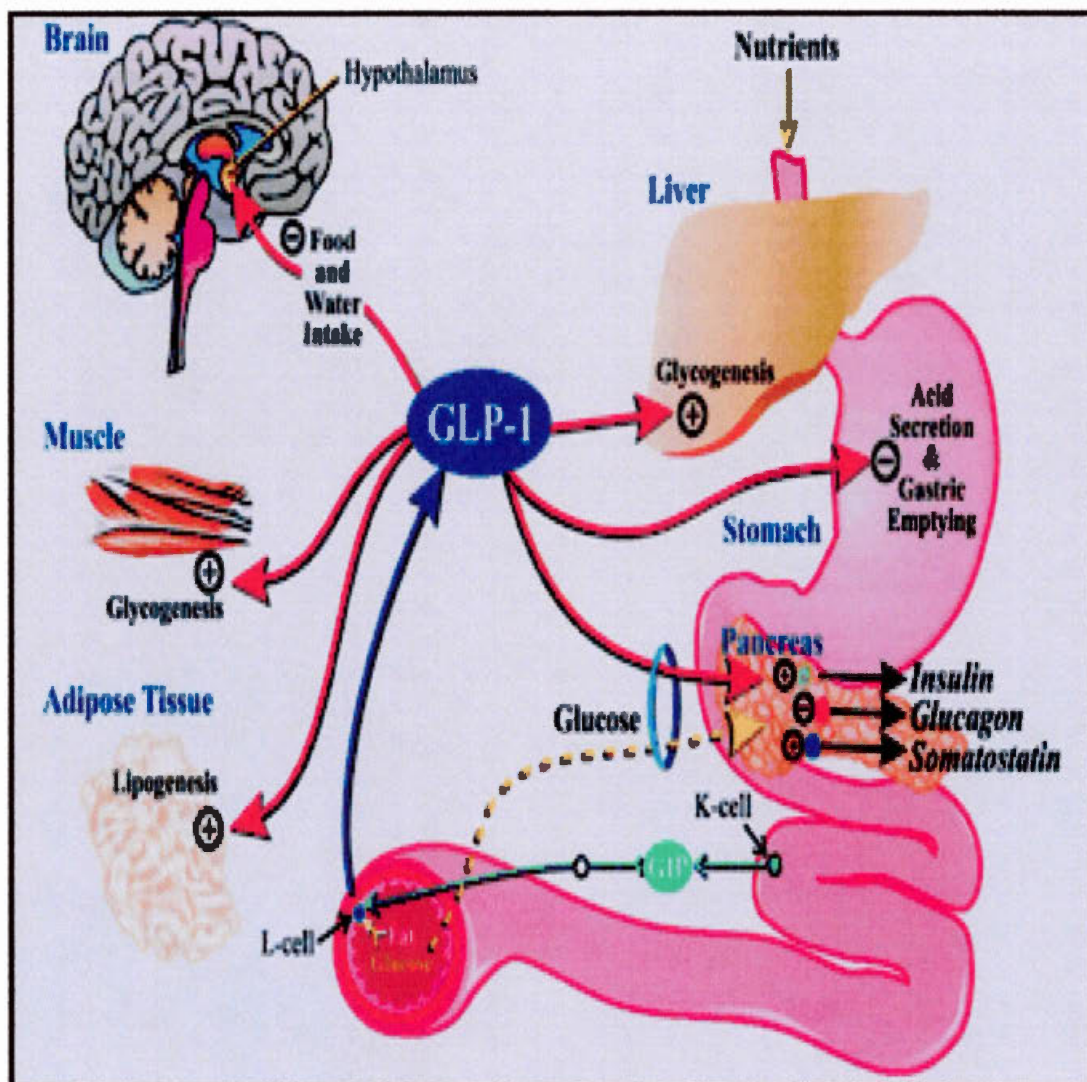
## 1.2 Le GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) et l'exendin-4

### 1.2.1 Les fonctions biologiques et thérapeutiques du GLP-1

Il y a maintenant un peu plus de 20 ans que le GLP-1 a été identifié comme étant une hormone incrétine importante, c'est-à-dire, une hormone intestinale capable de stimuler la sécrétion d'insuline suite à l'augmentation du taux de glucose sanguin. Le GLP-1 est produit par les cellules L intestinales suite au clivage protéolytique du gène du préproglucagon. Les formes biologiquement actives du GLP-1 sont le GLP-1(7-37) et le GLP-1(7-36) amide, produites suite au clivage par une prohormone convertase (PC) du GLP-1(1-37) après le résidu arginine en position six. Le GLP-1(7-36) amide est la forme majoritaire sécrétée par les cellules L intestinales, et c'est cette séquence peptidique qui sera utilisée dans le cadre de cette étude (Dhanvantari et *al*, 1996; Mojsov et *al*, 1986; Nauck et *al*, 1993).

Les actions physiologiques du GLP-1 reflètent la fonction des organes dans lesquels sont exprimés ses récepteurs spécifiques. Ces organes incluent le pancréas, l'estomac, les poumons, le cerveau, les reins, le cœur et le petit intestin. Le foie, les tissus adipeux et les muscles squelettiques contiennent aussi des récepteurs du GLP-1, mais leur action est moins bien définie (figure 1.3) (Bullock et *al*, 1996; Campos et *al*, 1994; Kieffer et Habener, 1999).

Une des fonctions premières du GLP-1 se situe au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques. Il a été démontré que cette hormone est un sécrétagogue puissant pour la sécrétion d'insuline dépendante du glucose (Holst et *al*, 1987; Kreyman et *al*, 1987; Mojsov et *al*, 1986). Selon une étude antérieure, des souris comportant une mutation au niveau du récepteur du GLP-1 deviennent intolérantes au glucose. Ce qui est important, c'est que l'action insulinothropique du GLP-1 est atténuée lorsque le niveau circulant de glucose diminue, ce qui empêche l'atteinte d'un stade hypoglycémique. Il existe donc une interdépendance entre le métabolisme du glucose et l'action du GLP-1 sur les cellules  $\beta$  pancréatiques (i.e., le glucose est essentiel pour



**Figure 1.3** Sommaire des actions physiologiques du GLP-1. Ce schéma résume les cibles connues de l'action du GLP-1. Dans le pancréas, le GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline et de somatostatine de manière dépendante du glucose et inhibe la sécrétion de glucagon. Le GLP-1 est un inhibiteur efficace de la vidange gastrique et induit aussi la satiété. Le GLP-1 pourrait avoir un effet sur les tissus adipeux, les muscles et le foie afin d'induire la lipogenèse et la glycogénèse, mais ces fonctions sont moins bien connues. (Tiré de Kieffer et Habener, 1999)

l'action du GLP-1 et le GLP-1 est essentiel pour rendre les cellules  $\beta$  compétentes à répondre au glucose) (Holz et *al*, 1993).

Non seulement le GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline, mais il stimule aussi la transcription du gène de la proinsuline et la biosynthèse de l'insuline. L'exposition de certaines lignées cellulaires à des concentrations de GLP-1 variant de 0.1 à 10 nM a permis d'augmenter le taux de transcription du gène de la proinsuline, l'ARNm de la proinsuline ainsi que sa biosynthèse. Le mécanisme par lequel le GLP-1 stimule la synthèse de l'insuline semble impliquer l'activation de la voie de signalisation dépendant de l'AMPC et celle des calcium-phospholipides. Il résulte en la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) et, par conséquent, la stimulation de la transcription du gène de la proinsuline (Drucker et *al*, 1987; Fehmann et Habener, 1992).

L'inhibition de la sécrétion de glucagon est aussi une action du GLP-1 sur les cellules  $\alpha$  pancréatiques. Parce que le glucagon induit la gluconéogenèse, l'inhibition de cet effet conduit à une diminution du taux de glucose sanguin (Perfetti et *al*, 1999). Cette suppression est causée, soit par l'action directe du GLP-1 sur le récepteur du glucagon, ou par une action paracrine entraînée par la libération d'insuline et de somatostatine (Kawai et *al*, 1989; Heller et *al*, 1997). La stimulation de la sécrétion de somatostatine serait aussi reliée à l'action du GLP-1 sur les cellules  $\alpha$  pancréatiques, son récepteur étant présent dans ces cellules (Fehmann et Habener, 1991).

Dans les cellules pariétales de l'estomac, où l'on retrouve son récepteur, le GLP-1 cause une inhibition de la sécrétion d'acide chlorhydrique. De plus, il provoque le ralentissement de la sortie des nutriments de l'estomac, ce qui a pour effet de diminuer la vitesse d'absorption du glucose par la muqueuse intestinale (Nauck et *al*, 1997a; Wettergren et *al*, 1997, Willms et *al*, 1996). Ce dernier effet s'ajoute

probablement à celui du GLP-1 sur la sécrétion d'insuline pour prévenir des changements trop importants dans la glycémie post-prandiale.

D'autre part, pour améliorer l'utilisation du glucose, le GLP-1 possède une activité périphérique sur les tissus sensibles à l'insuline. En effet, il a été démontré dans des études *in vitro* chez le rat que le GLP-1 permet une augmentation du métabolisme du glucose au niveau du foie et des muscles squelettiques en stimulant la synthèse du glycogène, l'activité de la glycogène synthase  $\alpha$  ainsi que l'utilisation et l'oxydation du glucose (Morales et *al*, 1997; Valverde et *al*, 1994; Villanueva-Penacarrillo et *al*, 1994). En plus de stimuler la glycogénèse, le GLP-1 aurait aussi une action au niveau du métabolisme des lipides et, comme pour le foie et les muscles squelettiques, il y aurait stimulation de certains paramètres impliqués dans le métabolisme du glucose (Miki et *al*, 1996; Perea et *al*, 1997; Ruiz-Grande et *al*, 1992).

Le GLP-1 est aussi synthétisé dans le système nerveux central (SNC). Des études autoradiographiques ont démontré qu'il est distribué à plusieurs endroits dans le cerveau, mais son ARNm correspondant prédomine surtout dans le tronc cérébral et, en plus petite quantité, dans l'hypothalamus (Kreymann et *al*, 1989; Shimizu et *al*, 1987). Cela pourrait expliquer pourquoi le GLP-1 semble jouer un rôle dans le contrôle de la satiété. L'administration intra-cérébroventriculaire (ICV) de GLP-1 et de leptine chez le rat inhibe le centre de la faim (Turton et *al*, 1996). Ainsi administré, le GLP-1 inhibe également la consommation d'eau, stimule l'excrétion urinaire d'eau, de sel et réduit la température corporelle chez le rat (Gutzwiller et *al*, 1999; Tang-Christensen et *al*, 2001; Zander et *al*, 2002).

Récemment, des études *in vitro* et *in vivo* ont semblé indiquer un rôle potentiel du GLP-1 dans la réplication et la néogenèse des cellules  $\beta$  pancréatiques. Le traitement prolongé de souris avec du GLP-1 augmente l'expression du facteur de transcription IDX-1 (*islet-duodenum homeobox-1*) qui est requis lors du développement du pancréas, ce qui indique que le GLP-1 pourrait stimuler la différenciation des cellules

ductales et initier la nouvelle formation de cellules  $\beta$  pancréatiques (Egan et *al*, 2003; Hui et *al*, 2001; Hussain et Habener, 2000; Tourrel et *al*, 2002; Xu et *al*, 1999). De plus, des résultats récents ont démontré que les acides gras libres, le glucose, les sulfonylurés et l'amyline induisent l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques, suggérant que le phénomène apoptotique pourrait être impliqué dans la pathogenèse du diabète de type 2 (Cerasi et *al*, 2000; Hui et *al*, 2003). Le GLP-1 aurait donc aussi une action au niveau de la diminution des cellules apoptotiques du pancréas, tel que démontré chez le rat Zucker diabétique (Farilla et *al*, 2002).

Toutes ces propriétés du GLP-1 supportent son rôle potentiel dans une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2. Son mode d'action se distingue des médicaments déjà existants, tels les hypoglycémiants de type sulfonylurés, qui agissent directement sur les canaux potassiques dépendant de l'ATP. Comme ces médicaments ne dépendent pas du taux de glucose, leur action persiste même lorsque le glucose sanguin est revenu à la normale, ce qui entraîne chez le patient un état hypoglycémique. Au contraire, la sécrétion de GLP-1 dépend de la concentration de glucose en circulation, tel que mentionné précédemment. Des études préliminaires avaient démontré l'efficacité du GLP-1 à contrôler l'hyperglycémie chez des individus souffrant de NIDDM, une administration intraveineuse ou sous-cutanée de GLP-1 permettant d'abaisser le taux de glucose sanguin à jeun pendant 4 à 5 heures (Nauck et *al*, 1997b, Toft-Nielsen et *al*, 1999). De plus, l'administration chronique de GLP-1 pendant une période de trois semaines chez un patient atteint de NIDDM a permis de réduire considérablement son taux de glucose plasmatique post-prandial, ainsi que sa concentration plasmatique de glucagon, mesurée 60 minutes après un repas (Todd et *al*, 1997).

#### 1.2.2 L'exendin-4

Il y a environ 15 ans, des chercheurs se sont intéressés à un lézard de l'espèce *Heloderma*, communément appelé *Gila monster*, que l'on retrouve dans plusieurs



états américains et qui est considéré comme venimeux. Le venin de ce lézard contient un certain nombre de peptides hautement bioactifs, incluant les peptides exendin-3 et exendin-4. Ces peptides furent nommés exendins par Eng et Raufman puisque qu'ils ont été isolés à partir d'une glande exocrine de l'animal, la glande salivaire, mais que par la suite, il a été démontré que leurs actions étaient de nature endocrine (Eng et *al*, 1990; Eng et *al*, 1992). Originellement, on avait assigné à l'exendin-4 un rôle dans la stimulation de la sécrétion d'amylase au niveau des cellules acineuses. Toutefois, des expériences ultérieures ont démontré que l'exendin-4 était aussi un puissant agoniste du récepteur du GLP-1 des mammifères, explicable par l'homologie à 53% de la séquence de l'exendin-4 avec celle du GLP-1. L'exendin-4 manifeste des propriétés fonctionnelles très similaires au GLP-1, c'est-à-dire la régulation de la sécrétion d'insuline et du glucagon, l'inhibition de la vidange gastrique, l'inhibition du centre de la faim, la stimulation de la réplication et de la néogenèse des cellules  $\beta$  pancréatiques et toutes autres fonctions attribuables au GLP-1. Par contre, ce qui est intéressant, c'est que l'action de l'exendin-4 est beaucoup plus puissante que celle du GLP-1 natif, ce qui en fait un candidat des plus prometteurs pour le traitement du diabète de type 2 (Aziz et Anderson, 2003; Egan et *al*, 2002; Raufman, 1996; Silvestre et *al*, 2003; Stoffers et *al*, 2003; Xu et *al*, 1999).

### 1.3 Le récepteur et les voies de signalisation du GLP-1 et de l'exendin-4

Le récepteur du GLP-1 est le seul parmi les récepteurs de sa famille à avoir été cloné (Thorens et *al*, 1993). Contenant 463 acides aminés, il est apparenté au récepteur du glucagon, puisqu'il est constitué de sept domaines transmembranaires. Il est formé d'un domaine hydrophobe en N-terminal qui permet la translocation de la protéine à l'intérieur du réticulum endoplasmique rugueux. Il contient aussi un domaine hydrophile où se trouvent trois sites de glycosylation et six résidus de cystéine. On retrouve ce même domaine hydrophile dans le récepteur du glucagon.

Enfin, sept domaines hydrophobes forment les parties transmembranaires qui précèdent l'extrémité intracellulaire carboxy-terminale (Thorens, 1992).

Les connaissances disponibles indiquent que l'exendin-4 exerce la majorité de ses effets sur la diminution du glucose par sa liaison au récepteur du GLP-1. Il n'y a pas d'études à ce jour ayant démontré l'existence d'un récepteur séparé fonctionnel à l'exendin-4 qui pourrait agir sur l'homéostasie du glucose. Par contre, certains effets du GLP-1 et de l'exendin-4 ont été observés dans des systèmes expérimentaux qui n'exprimaient pas le récepteur connu du GLP-1, d'où l'hypothèse de l'existence possible d'un second récepteur (Delgado et *al*, 1995; Nishizawa et *al*, 2000; Valverde et *al*, 1993).

### 1.3.1 La voie de la protéine kinase A

La liaison du GLP-1 et de l'exendin-4 aux cellules  $\beta$  du pancréas déclenche le processus de libération d'insuline. La principale voie de signalisation est celle qui active la protéine kinase A, à partir d'une augmentation de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) (Drucker et *al*, 1987; Van Eyll et *al*, 1994). Ainsi, le peptide se fixe à son récepteur, qui se lie à une protéine G stimulatrice (Gs). Cette liaison provoque la phosphorylation de trois sites dans la région C-terminale du récepteur, où sont situés de nombreux résidus de sérine et de cystéine. Ce phénomène induit une interaction entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine. Cette phosphorylation a pour but de prévenir une activation ultérieure de la protéine G lorsque le GLP-1 est lié à son récepteur. Par la suite, il y a dissociation de la sous-unité  $\alpha$  liée au GDP de la protéine G. Ce GDP sera par la suite éliminé, pour être remplacé par le GTP, résultant en un complexe  $GS\alpha$ -GTP. Ce complexe se lie à l'adénylyl cyclase et induit la production d'AMPC. L'augmentation d'AMPC entraîne l'activation de la protéine kinase A, qui peut stimuler la sécrétion d'insuline en provoquant directement l'exocytose des granules d'insuline (figure 1.4). Lorsque le

GTP est hydrolysé, la production d'AMPc est interrompue, ainsi que la sécrétion d'insuline (Egan et *al*, 2003; Gromada et Rorsman, 1996; Widmann et *al*, 1997).

La présence de glucose et l'augmentation d'AMPc, qui active la protéine kinase A, entraîne la fermeture des canaux potassiques qui dépendent de l'adénosine triphosphate (ATP) et l'ouverture de canaux calciques de type L dépendants du voltage. Le processus de fermeture débute par la diffusion facilitée du glucose dans les cellules  $\beta$  du pancréas à l'aide du transporteur GLUT2. Ce phénomène initie la glycolyse, donc la phosphorylation du glucose qui entraîne une augmentation du rapport ATP/ADP à l'intérieur des cellules et une diminution du potentiel membranaire. Par la suite, il y a ouverture des canaux calciques de type L dépendants du voltage (Lu et *al*, 1993). Ainsi, une entrée de calcium initie une cascade d'événements permettant l'exocytose des granules d'insuline.

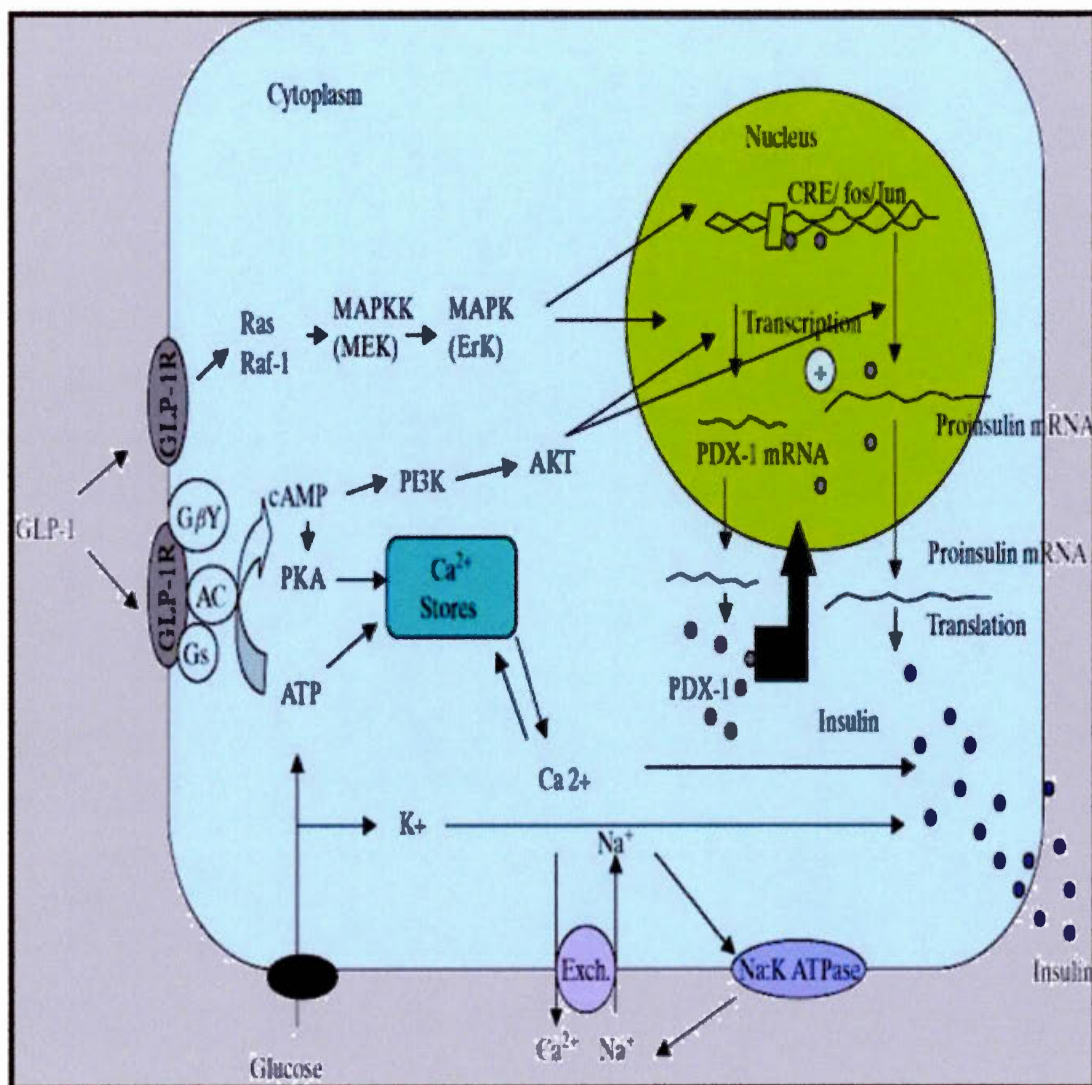
### 1.3.2 La voie de la phospholipase C

Des lignées de cellules Cos-7 ont été utilisées pour étudier en profondeur le mécanisme d'action du récepteur du GLP-1. Ce sont des cellules dont l'ADN complémentaire (ADNc) code pour le récepteur du GLP-1, qui est exprimé dans une lignée cellulaire rénale de singe. Les résultats obtenus indiquent que le récepteur du GLP-1 peut se coupler de façon équivalente à une protéine G reliée à la phospholipase C (PLC) et à l'adénylyl cyclase. Cette PLC permet de scinder les phospholipides contenant du glycérol, produisant ainsi du diacylglycérol (DG) et de l'inositol triphosphate (IP3). L'IP3 permet d'augmenter la concentration du calcium intracellulaire en libérant le calcium emprisonné dans des vésicules intracellulaires. Il en résulte une sécrétion d'insuline, puisque l'augmentation de calcium stimule l'exocytose des granules d'insuline et provoque un changement dans l'activité électrique des cellules  $\beta$  (figure 1.4). De plus, l'IP3 peut induire la dépolarisation membranaire qui permettra l'ouverture de canaux calciques (Wheeler et *al*, 1995).



### 1.3.3 La voie des MAP (*mitogen activated protein*) kinases (MAPK)

Les MAPK sont des kinases cytoplasmiques de type sérine/thréonine qui transmettent les signaux extracellulaires au noyau via la phosphorylation de facteurs de transcription et autres molécules de signalisation (Cobb et Goldsmith, 1995; Davis, 1995). La voie de signalisation des MAPK est activée par plusieurs stimuli extracellulaires, incluant les facteurs de croissance, qui interagissent au niveau de la surface cellulaire des récepteurs tyrosine kinase. Il a été démontré récemment que plusieurs récepteurs couplés aux protéines G sont capables de stimuler l'activité de deux membres de la famille des MAPK, soit ERK et p38 MAPK (Yamauchi et *al*, 1997). Le GLP-1 et l'exendin-4 sont considérés comme des facteurs de croissance impliqués dans l'augmentation de la prolifération et de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ces mécanismes d'action seraient donc activés entre autre par la voie de signalisation des MAPK au niveau des récepteurs couplés aux protéines G. Récemment, l'activation de la p38 MAP kinase par le GLP-1 a été démontrée dans les cellules CHO et les cellules RIN de type insulinome (Montrose-Rafizadeh et *al*, 1999).



**Figure 1.4** Modèle du mécanisme moléculaire des principales voies de signalisation du GLP-1. Suite à la liaison du GLP-1 à son récepteur, une fermeture des canaux KATP dépendants de l'AMPc et une augmentation du niveau de calcium intracellulaire déclenchent la sécrétion d'insuline dépendante du glucose. La liaison du GLP-1 à son récepteur permet aussi l'activation des voies de signalisation de la PI3K et de Ras, engendrant ainsi une augmentation de la transcription du gène de l'insuline et du contenu intracellulaire en insuline. Ces derniers sont médiés par une augmentation du niveau intracellulaire de PDX-1 et par sa liaison au promoteur de l'insuline. (Tiré de Egan et *al*, 2003)

## 1.4 Le catabolisme du GLP-1 et de l'exendin-4

### 1.4.1 L'élimination du GLP-1 et de l'exendin-4

L'action biologique du GLP-1 est de courte durée, le temps de demi-vie étant d'environ 2 minutes. L'élimination de la circulation de la forme bioactive du GLP-1 est principalement due à trois mécanismes différents : la clairance rénale, la clairance hépatique et la dégradation en circulation. L'organe responsable principalement de l'élimination du GLP-1 est le rein, qui contrôle aussi la clairance de plusieurs autres peptides dérivés du proglucagon, dont le glucagon, le GLP-2 et la glicentine. Des études ont montré que le GLP-1 est présent à des concentrations élevées chez les patients urémiques, ce qui indique que le rein joue un rôle significatif dans l'élimination de ce peptide (Orskov et *al*, 1992). Le mécanisme principal de la clairance du GLP-1 par les reins impliquerait la filtration glomérulaire, suivie par la réabsorption et l'hydrolyse de la molécule dans le néphron proximal. Le foie et les poumons ne sont pas responsables de l'élimination du GLP-1 en dessous des concentrations basales, mais ces deux organes ont pu éliminer efficacement le GLP-1 infusé chez le porc (Deacon et *al*, 1996). Enfin, il n'y a pas que la clairance rénale qui soit responsable de l'élimination du GLP-1, mais aussi l'action des protéases, telles la dipeptidyl peptidase IV (DP IV) et la NEP (*neutral endopeptidase*), qui jouent un rôle très important.

L'exendin-4, comme mentionné précédemment, manifeste une action biologique plus puissante que le GLP-1. Le temps de demi-vie en circulation de l'exendin-4 est d'environ 30 minutes, ce qui en fait un peptide beaucoup plus stable que le GLP-1. Le processus d'élimination de l'exendin-4 est attribuable en grande partie à la clairance rénale, puisque cette hormone est résistante à la dégradation enzymatique par la dipeptidyl peptidase IV (DP IV) et la NEP (Simonsen et *al*, 2006).

#### 1.4.2 La dégradation du GLP-1 et de l'exendin-4

De tous les peptides dérivés du proglucagon, c'est la dégradation du GLP-1 qui a été la plus caractérisée. Ainsi, plusieurs études ont démontré que le GLP-1(7-36)amide est dégradé et inactivé par l'enzyme dipeptidyl peptidase IV, qui clive le peptide après l'alanine en N-terminal pour produire le dipeptide His-Ala et le fragment GLP-1(9-36)amide. Cette forme tronquée est le métabolite majeur produit suite à la dégradation du GLP-1 (Deacon et *al*, 1995; Mentlein et *al*, 1993; Pauly et *al*, 1996). Dans des études *in vivo* chez le rat, il a été estimé que la DP IV clive 50% de la quantité de GLP-1 infusée, et cela à l'intérieur d'une période de 2 minutes. Au contraire, le GLP-1 demeure intact pendant au moins 10 minutes chez les rats déficients en DP IV (Kieffer et *al*, 1995). Trente minutes après l'administration sous-cutanée de GLP-1 chez l'humain, le métabolite GLP-1(9-36)amide compte pour environ 78% du GLP-1(7-36)amide immunoréactif (Deacon et *al*, 1995). Des études de liaison au récepteur du GLP-1 suggèrent que le métabolite résultant du clivage par l'enzyme DP IV, le GLP-1(9-36)amide, peut se lier au récepteur du GLP-1, mais avec une affinité beaucoup plus faible. De plus, le GLP-1(9-36)amide serait capable d'antagoniser la capacité du GLP-1 natif à générer une activité de l'adénylate cyclase par le récepteur pancréatique du GLP-1 (Knudsen et Pridal, 1996; Montrose-Rafizadeh et *al*, 1997). L'activité de la DP IV semble être inhibée à basse température et par la diprotine A, un tripeptide bactérien agissant comme inhibiteur compétitif de la DP IV (Kieffer et *al*, 1995).

Plus récemment, des études *in vitro* ont montré que le GLP-1 est aussi clivé par l'enzyme protéolytique NEP (*neutral endopeptidase*). La NEP clive le GLP-1 à dix endroits différents, mais c'est entre les résidus Phe<sup>28</sup> et Ile<sup>29</sup>, ainsi qu'entre les résidus Trp<sup>31</sup> et Leu<sup>32</sup>, que l'action de la NEP est la plus rapide (Hupe-Sodmann et *al*, 1997; Thum et *al*, 2002).

L'exendin-4 n'est pas dégradé ou inactivé par l'enzyme dipeptidyl peptidase IV, qui clive le GLP-1 après l'alanine en N-terminal, puisque la séquence peptidique de

l'exendin-4 contient une glycine en position 2. Ceci explique pourquoi l'exendin-4 possède un temps de demi-vie plus élevé que le GLP-1 (Parkes et *al*, 2001).

### 1.5 La technologie des DAC<sup>TM</sup> (complexe d'affinité pharmacothérapeutique)

La technologie du complexe d'affinité pharmacothérapeutique (DAC<sup>TM</sup>) a été développée par ConjuChem et relève les défis déjà anciens que sont la protection des peptides contre leur dégradation par les peptidases et la prévention de leur élimination rapide par voie rénale, faisant ainsi du développement des médicaments peptidiques une réalité. La technologie DAC<sup>TM</sup> est basée sur deux points :

- La modification synthétique d'un fragment peptidique bien caractérisé peut produire un analogue peptidique contenant un groupe chimique réactif, mais conservant l'essentiel de son activité biologique d'origine. Le peptide modifié est désigné sous le nom de « complexe d'affinité pharmacothérapeutique » (DAC<sup>TM</sup>).
- Suite à la réaction du fragment actif, la liaison du DAC<sup>TM</sup> au thiol libre de la cystéine 34 de l'albumine résulte en un bioconjugué thérapeutique.

La liaison d'un DAC<sup>TM</sup> à l'albumine peut s'effectuer de deux manières : *in vivo* à l'albumine circulante, suite à une administration parentérale ; ou *ex vivo* à l'albumine recombinante ou purifiée, qui est ensuite administrée par injection parentérale en tant que conjugué préformé. La liaison covalente d'un DAC<sup>TM</sup> à l'albumine étant permanente, le peptide n'a pas à être libéré de l'albumine pour remplir sa fonction biologique. Chaque DAC<sup>TM</sup> est composé de trois éléments, soit le groupe actif (la partie responsable de l'activité biologique), un connecteur relié au groupe actif et un groupe chimique réactif à l'extrémité opposée du connecteur, généralement un électrophile mou, sélectif pour les thiols, le maléimide étant le représentant le plus utile.

En règle générale, les peptides naturels se dégradent et sont éliminés rapidement *in vivo*. La liaison covalente à l'albumine peut enrayer le clivage opéré par les peptidases, ainsi que les différents mécanismes d'élimination d'un grand nombre de

peptides, indépendamment de la structure, de l'activité et de la catégorie thérapeutique de ceux-ci. En outre, la conjugaison du médicament à l'albumine permet une large distribution des DAC<sup>TM</sup> dans tout l'organisme, à l'exception du cerveau ; en effet, les DAC<sup>TM</sup> ne traversent généralement pas la barrière hémato-encéphalique. La réaction du DAC<sup>TM</sup> *in vivo* est hautement sélective pour l'albumine sérique, par rapport à d'autres protéines. Cela résulte, d'une part, de la présence de concentrations beaucoup plus élevées d'albumine dans le plasma et les fluides interstitiels et, d'autre part, du fait que l'albumine contient un groupement thiol plus réactif que les autres molécules présentes dans le plasma et la lymphe. En outre, à l'état physiologique, le thiol de la cystéine 34 de l'albumine se caractérise par une réactivité maximale vis-à-vis le maléimide ([www.conjuchem.com](http://www.conjuchem.com)).

#### 1.5.1 La conjugaison à l'albumine

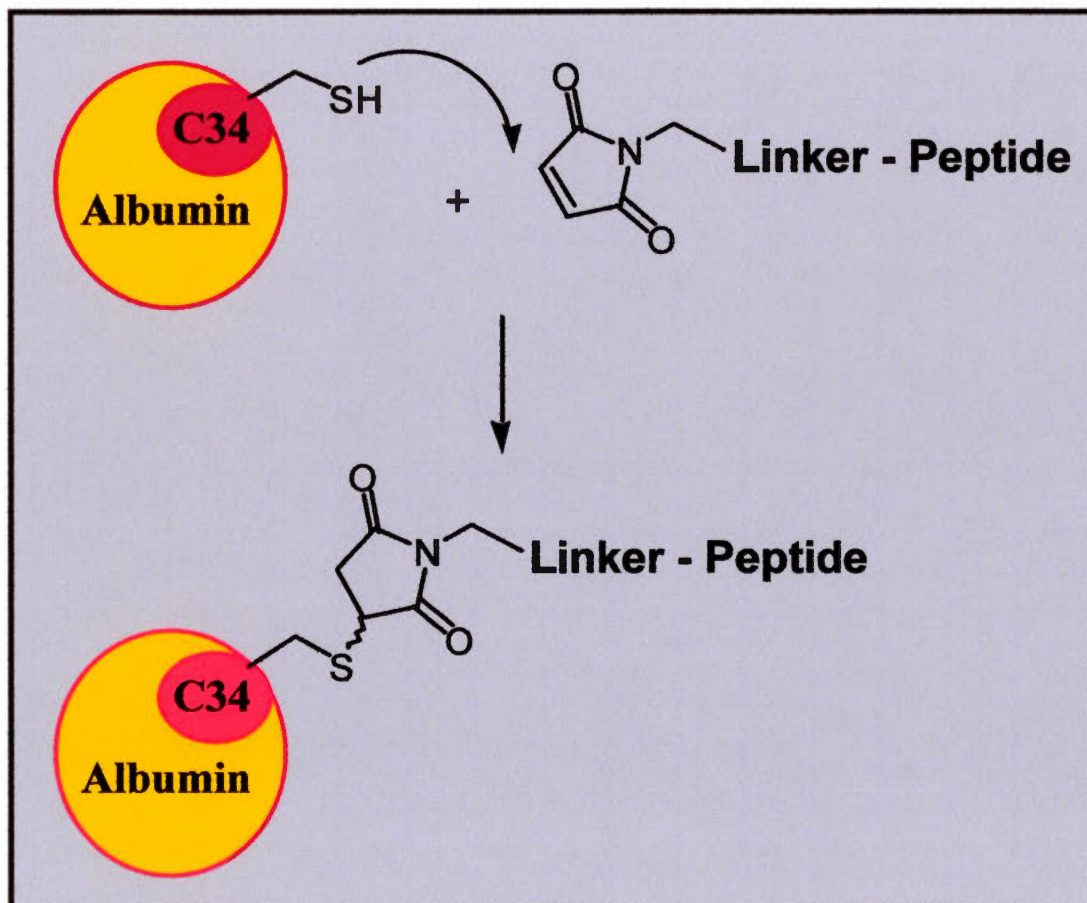
A la lumière de cette technologie innovatrice, l'albumine et ses propriétés jouent un rôle important dans l'action systémique des DAC<sup>TM</sup> bioconjugués. L'albumine est probablement la protéine la plus connue et la plus étudiée. Ses diverses fonctions ont attiré plusieurs scientifiques depuis des générations. L'albumine est la protéine soluble la plus abondante chez tous les vertébrés et la plus abondante dans le plasma. L'albumine ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, elle n'est pas excrétée par le foie ni par les reins, elle se diffuse presque partout dans l'organisme et peut-être utilisé pour atteindre le sang, les tissus et/ou les organes (Peters, 1996). Contrairement à plusieurs autres protéines qui possèdent un pouvoir de mutation et un polymorphisme plus élevé, les variantes génétiques de l'albumine sont très rares et bénignes. L'albumine est une chaîne qui n'est pas glycosylée de 585 acides aminés repliée en trois domaines par 17 ponts disulfures intra-chaîne. Ce qui caractérise la composition de la séquence d'acides aminés de l'albumine est son faible nombre de résidus tryptophane, soit un ou deux par molécule. Les résidus méthionine, glycine et isoleucine sont aussi présents en faible quantité, ce qui distingue aussi l'albumine des



autres protéines (Peters, 1996). Par contre, les résidus de cystéine y abondent. C'est ce qui permet au DAC<sup>TM</sup> de venir se lier à un résidu cystéine libre spécifique, situé en position 34 de la séquence de l'albumine humaine (figure 1.5), et de venir former un complexe bioconjugué qui permet d'atteindre la cible biologique. La structure du complexe d'albumine conjugué a aussi été caractérisée par cristallographie aux rayons X (figure 1.6).

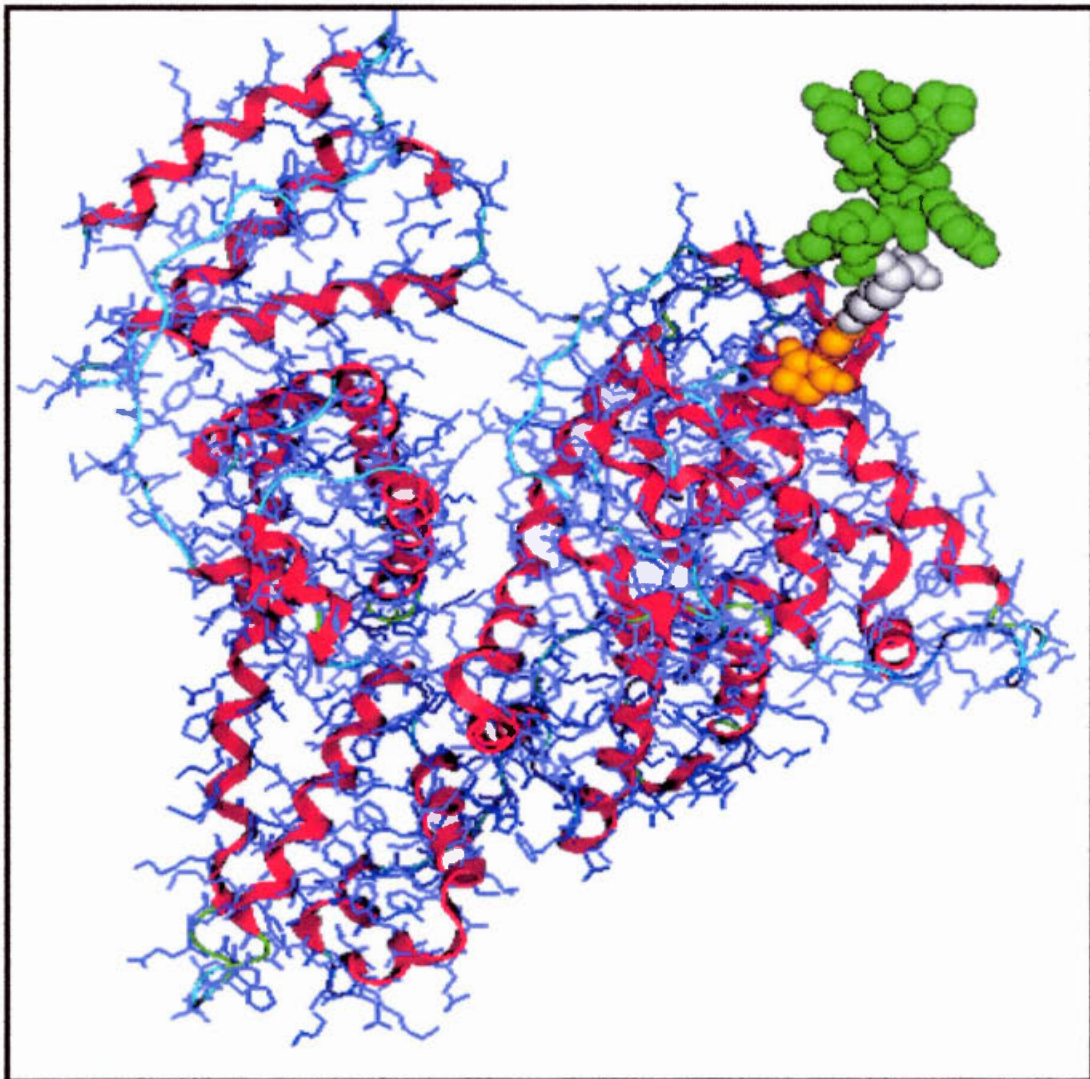
#### 1.6 La technologie des PC-DAC<sup>TM</sup> (conjugué préformé-complexe d'affinité pharmacothérapeutique)

ConjuChem a développé le conjugué préformé-complexe d'affinité pharmacothérapeutique (PC-DAC<sup>TM</sup>) pour compléter son complexe d'affinité-pharmacothérapeutique (DAC<sup>TM</sup>). Les conjugués préformés représentent un prolongement naturel de la technologie DAC<sup>TM</sup> de base. Les peptides DAC<sup>TM</sup> et PC-DAC<sup>TM</sup> sont conçus pour conserver les propriétés thérapeutiques du peptide d'origine, tout en garantissant une durée d'activité très prolongée. Dans la technologie PC-DAC<sup>TM</sup>, les peptides sont conçus pour se lier de manière covalente à l'albumine hors de l'organisme (bioconjugaison *ex vivo*). Le PC-DAC<sup>TM</sup> réagit à une source externe d'albumine pour former le produit médicamenteux, qui est ensuite injecté par voie sous-cutanée. L'albumine humaine purifiée ne peut être utilisée dans un produit médicamenteux du fait des risques inhérents à son origine. Une source d'albumine humaine recombinante est donc utilisée pour la technologie PC-DAC<sup>TM</sup>. L'un des principaux avantages de cette technologie est que la quasi-totalité du peptide DAC<sup>TM</sup> est liée à la cystéine-34 de l'albumine ([www.conjuchem.com](http://www.conjuchem.com)).



**Figure 1.5** Représentation de l'interaction entre le DAC™ et l'albumine. Le maléimide du peptide DAC™ va se lier de manière covalente à la cystéine libre en position 34 de l'albumine pour former un complexe bioconjugué.





**Figure 1.6** Structure d'un complexe d'albumine bioconjugué à un peptide bioactif caractérisée par cristallographie aux rayons X.

## 1.7 Albumine et immunogénicité

### 1.7.1 Immunogénicité des protéines thérapeutiques

Les protéines thérapeutiques ont révolutionné le traitement d'un grand nombre de maladies au cours des dernières décennies. L'identification récente des quelques 30 000 gènes du génome humain rend désormais possible l'introduction de plusieurs nouvelles protéines thérapeutiques sur le marché. L'augmentation des connaissances au niveau du potentiel bénéfique des protéines thérapeutiques entraîne également la question du potentiel immunogénique de telles molécules. Le système immunitaire peut détecter des différences infimes entre une molécule exogène et une molécule native, qui est habituellement immunotolérante. Donc, toute molécule exogène introduite dans le corps humain ou animal a le potentiel de générer la production d'anticorps (Schellekens, 2002; 2003 :2005).

En théorie, plus la protéine exogène diffère par sa structure de la protéine native, plus elle devrait être immunogène. Il est donc raisonnable de prédire que les protéines isolées de tissus ou de sérum humains sont moins immunogènes que les protéines ne provenant pas de l'humain; en général, il s'avère que c'est le cas. La relation entre le potentiel des protéines thérapeutiques et l'immunogénicité soulève trois problématiques principales. Premièrement, l'apparition d'une réaction allergique sévère ou d'un choc anaphylactique. Deuxièmement, une réponse immunitaire à une protéine thérapeutique pourrait réduire son efficacité. Troisièmement, il est possible qu'une réponse immunitaire à une protéine exogène puisse induire l'auto-immunité envers la protéine endogène (Porter, 2001).

Plusieurs facteurs peuvent ainsi influencer l'immunogénicité des protéines thérapeutiques et ce ne sont pas tous ces facteurs qui sont bien compris. On retrouve entre autre le bagage génétique du patient, le type de maladie, le type de protéine, la voie d'administration, la fréquence du dosage, la durée du traitement, le processus de manufacture ainsi que le transport et l'entreposage (Schellekens, 2002).

L'exendin-4 représente un bon exemple d'une molécule possédant un certain potentiel immunogénique puisque ce peptide provient du *Gila Monster*, une espèce bien éloignée de l'être humain. Malgré son homologie de séquence avec le GLP-1 et le fait d'être un agoniste puissant de son récepteur, il n'en demeure pas moins que le traitement des patients avec l'exendin-4 semble indiquer une tendance vers la hausse de la réponse immunitaire. Même si cette réponse immune n'est pas de grande envergure, l'effet à long terme d'un tel traitement sur l'efficacité de ce dernier et sur la sécurité du patient ne doit pas être négligé.

#### 1.7.2 La conjugaison à l'albumine, une solution à l'immunogénicité

Plusieurs moyens ont été suggérés par lesquels les protéines thérapeutiques pourraient être modifiées afin de réduire leur immunogénicité. Une procédure courante consiste à l'attachement covalent d'une chaîne de polyéthylène glycol (PEG) aux molécules de lysine se trouvant à la surface de la protéine. Le PEG est une molécule inerte, non toxique, non-immunogénique et très soluble utilisée dans la préparation de plusieurs produits manufacturiers, tels les cosmétiques et les produits alimentaires. Le PEG agirait comme un bouclier mécanique protégeant l'épitope antigénique de la protéine thérapeutique (Shiffman, 2001). L'identification et l'élimination de l'épitope des protéines T responsable de la formation des anticorps pourrait mener à la production d'une molécule dont l'immunogénicité serait réduite. C'est un processus que l'on nomme mutagénèse du site spécifique, qui consiste à remplacer des acides aminés spécifiques par d'autres acides aminés comme l'alanine, par exemple, ce qui permettrait d'éliminer la séquence antigénique (Adair et Ozanne, 2002; Wan et al, 2002). Une autre stratégie pour sélectionner et remodeler les protéines thérapeutiques est le processus connu sous le terme de *exon shuffling*, qui permet l'évolution dirigée des protéines par l'altération de la position dans le gène des régions codant pour la protéine, afin d'en améliorer les caractéristiques. Ce procédé pourrait générer une librairie dans laquelle toutes les séquences seraient

humaines et ne possèderaient pas le point de mutation qui cause l'immunogénicité (Kolkman et Stemmer, 2001). Il existe un autre procédé, l'humanisation des anticorps monoclonaux, qui s'applique aussi aux protéines thérapeutiques. Cette méthode consiste à remplacer la région de la protéine exogène avec la séquence humaine, ce qui devrait permettre d'éliminer l'épitope antigénique (Klingbeil et Hsu, 1999). Cependant, plusieurs de ces méthodes demandent encore des analyses et des études approfondies.

L'albumine pourrait aussi jouer un rôle dans la réduction de l'immunogénicité lorsque conjuguée à une molécule possédant des propriétés immunogènes. Des études antérieures ont démontré cette propriété il y a plusieurs années en conjuguant la superoxide dismutase (SOD) à l'albumine, ce qui entraînait non seulement une augmentation du temps de demi-vie et de la stabilité en circulation, mais aussi une réduction de l'immunogénicité comparativement à la molécule native (Mao et Poznansky, 1989; Wong, Cleland et Poznansky, 1980). La conjugaison d'une molécule étrangère au corps humain à l'albumine humaine devrait donc permettre d'empêcher la reconnaissance de cette molécule exogène par le système immunitaire et la protégerait de la dégradation. Cette technologie pourrait aboutir en une multitude de possibilités pour des molécules thérapeutiques puissantes, mais exogènes par rapport à l'humain. C'est le cas pertinent de l'exendin-4, qui est une molécule étrangère au système immunitaire humain, mais qui possède des propriétés puissantes et thérapeutiques pour le traitement du diabète de type 2.

## 1.8 Objectifs

Ce projet d'étude a pour but de comprendre et de généraliser le mécanisme de protection de peptides hormonaux tels le GLP-1 et, plus spécialement, l'exendin-4, suite à leur conjugaison à l'albumine. La conjugaison à l'albumine vise non seulement à améliorer le profil pharmacodynamique et pharmacocinétique des molécules thérapeutiques natives en augmentant leur stabilité face à la dégradation enzymatique, mais elle permettrait aussi la diminution du potentiel immunogénique de molécules exogènes, tel l'exendin-4 dans le cas présent. L'expérimentation *in vivo* est destinée à évaluer le potentiel insulinothropique du GLP-1, de l'exendin-4 et des différents dérivés (DAC<sup>TM</sup>, PC-DAC<sup>TM</sup>) chez la souris diabétique ayant subi une modification au niveau du gène de la leptine. Ces études pharmacodynamiques permettent d'évaluer la capacité de chacun des peptides à l'étude de diminuer le taux de glucose sanguin par rapport au contrôle. L'expérimentation *in vivo* chez le rat Sprague Dawley permet d'évaluer le profil pharmacocinétique de chacun des composés afin d'établir le niveau de stabilité en circulation des dérivés versus des peptides natifs. Le potentiel de liaison des peptides natifs et des dérivés au récepteur du GLP-1 chez les cellules CHO est aussi évalué. Finalement, la réduction de l'immunogénicité de l'exendin-4 suite à la conjugaison à l'albumine de rat et à l'albumine humaine est évaluée chez le rat Sprague Dawley. Le but ultime de cette étude est de mieux comprendre, d'analyser et d'évaluer le pouvoir de protection que la conjugaison à l'albumine confère aux peptides hormonaux et, plus spécialement, à l'exendin-4, afin de mettre au point un agent thérapeutique plus puissant et plus stable qui servirait à traiter le diabète de type 2.

## CHAPITRE II

### MÉTHODOLOGIE

#### 2.1 Synthèse et purification peptidiques

L'assemblage de la séquence peptidique de l'exendin-4 (1-39)-NH<sub>2</sub> (H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH<sub>2</sub>), du GLP-1 (7-36)-NH<sub>2</sub> (H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-K-G-R-NH<sub>2</sub>), ainsi que celle des différents dérivés a été réalisé par la méthode de synthèse peptidique sur phase solide.

Un synthétiseur Symphony automatisé (Protein Technologies Inc.) a été utilisé pour assembler séquentiellement les acides aminés du peptide sur un support de résine de type Rink Amide MBHA adapté à la chimie Fmoc (9-fluorénylméthoxyloxycarbonyl). Chacun des acides aminés de l'exendin-4, du GLP-1 et des dérivés, préalablement protégés en position  $\alpha$ -amine par le groupement Fmoc, ont été couplés un à un à la résine, en débutant par l'acide aminé en C-terminal. La formation du lien amide à chaque cycle s'est effectuée en présence de l'agent de couplage HBTU (O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetraméthyl-uronium hexafluorophosphate) et d'une amine tertiaire, la DIEA (diisopropyléthylamine), dans un solvant permettant la solvation de la résine, tel le DMF (N,N-diméthylformamide). Une fois le couplage terminé, le groupement protecteur Fmoc était éliminé par une réaction avec une solution à 20% (v/v) de pipéridine dans du DMF pendant 20 minutes. Cette « déprotection » du groupe Fmoc a été suivie de courts lavages (1 min) du peptide-résine au DMF (3 fois), à l'isopropanol (3 fois) et au DMF (3 fois), avant de passer au cycle de couplage suivant.



Après le dernier cycle de couplage, les peptides ont été à la fois libérés de la résine et complètement dégagés de leurs groupes de protection temporaires sur les chaînes latérales fonctionnelles, au moyen d'un mélange contenant de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 85% (v/v), du triisopropylsilane, du thioanisole et du phénol à 5% (v/v) chacun. Après une heure de réaction à la température de la pièce, la résine a été filtrée sous vide sur verre fritté (porosité *coarse*), la résine lavée avec de petites portions de TFA, et le TFA évaporé sous vide jusqu'à un sirop qui a été trituré avec un excès d'éther anhydre. Le précipité blanc a été filtré sous vide sur verre fritté (porosité *medium*). Le peptide brut a été séché au dessiccateur sous vide mécanique (5 microns) pendant 12 heures en présence de pastilles solides de KOH. Le schéma de la figure 2.1 illustre ces étapes.

Avant de passer à la purification des peptides, leur profil chromatographique a été révélé par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) analytique, afin de déterminer la présence et les propriétés chromatographiques des contaminants par rapport au peptide désiré. Une fois cette information obtenue, les peptides bruts ont été dissous dans un mélange d'acétonitrile/TFA 0.1% de concentration appropriée (10% à 15% v/v) et injectés sur une colonne de HPLC préparative en phase inversée (Luna 10 $\mu$  phenyl-hexyl, 21 mm x 25 cm, Phenomenex Inc.) attachée à un système de marque Varian (Rainin). Le système était relié à un détecteur UV (Varian Dynamax UVD II) permettant la détection simultanée des pics de peptide à des longueurs d'onde de 214 nm et 254 nm. Un gradient d'élution typique pour effectuer la purification des peptides s'étalait de 30-55% (v/v) en acétonitrile/TFA 0.1% (v/v), sur une période de 180 min et à un débit de 9.5 ml/min. La pureté et l'identité de chacun des peptides ainsi purifiés a été évaluée par un système HPLC en phase inverse analytique combiné à un spectromètre de masse (Hewlett Packard LCMS-1100), permettant l'analyse directe des poids moléculaires et basé sur le mode de détection *electrospray*.

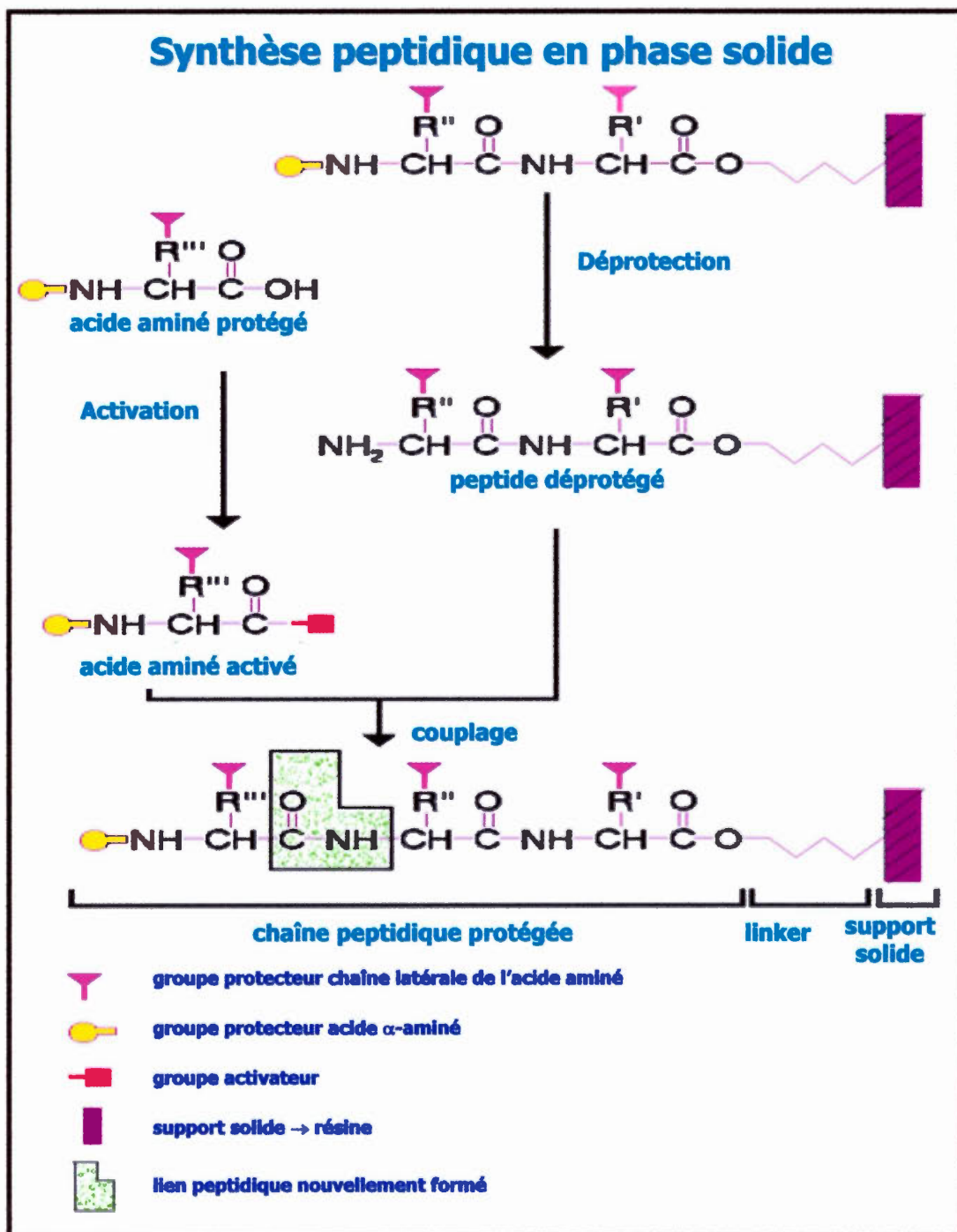
### 2.1.1 Synthèse et purification des peptides DAC™

La synthèse des peptides exendin-4 et GLP-1 ainsi que des dérivés sous forme de DAC™ a été exécutée selon la méthode détaillée décrite dans la section 2.1. Cependant, un résidu de lysine protégé en position N-ε de la chaîne latérale par le groupe Aloc (allyloxycarbonyl) a été introduit en C-terminal comme premier acide aminé de la séquence peptidique. Une fois l'assemblage de la séquence du peptide complété, ce groupe de protection peut être éliminé spécifiquement en traitant la résine pendant deux heures avec 3 équivalents de Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (Tetrakis triphénylphosphine) palladium (0)) dissous dans le mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>/NMM/HOAc (chloroforme/N-méthylmorpholine/acide acétique) (18:1 :0.5). Le peptide protégé sur résine avec la lysine libre a ensuite été lavé avec des portions de 10 ml/g de CHCl<sub>3</sub>, 20% AcOH/DCM et DMF. L'amine libre en position N-ε de la chaîne latérale de la lysine a alors pu réagir avec du MPA (acide 3-maléimidopropionique), qui permet le couplage sélectif avec la fonction SH en position 34 de l'albumine. Dans certains cas, un bras d'espacement (*linker*), tel AEEA (acide aminoéthoxyéthoxyacétique) a été ajouté entre la lysine en C-terminal et le MPA afin de créer différentes longueurs de liaison entre les peptides fonctionnels et l'albumine. Le clivage du peptide de la résine, les étapes de purification par HPLC et l'analyse de la pureté par HPLC-MS sont les mêmes que décrites dans la section 2.1.

### 2.1.2 Synthèse, purification et caractérisation des conjugués pré-formés

Les PC (conjugués pré-formés) sont synthétisés à partir d'un peptide DAC™ de l'exendin-4 et d'albumine sérique. Aux fins de cette étude, de l'albumine humaine ou de l'albumine de rat Sprague Dawley ont été utilisées. L'albumine humaine provenait d'une source commerciale (Cortex-Biochem, CA) tandis que l'albumine de rat a été extraite et purifiée dans notre laboratoire au moyen d'un système FPLC ÄKTApurifier (*fast protein liquid chromatography*) (Amersham Biosciences) à partir





**Figure 2.1** Schéma général des étapes d'une synthèse peptidique.

du sérum de rats Sprague Dawley avant de procéder à la conjugaison. Le sérum a été élué sur une colonne d'affinité HitrapBlue 50 ml (1.6 cm x 25 cm) (Amersham Biosciences), utilisant un gradient d'élution de 0-100% B (20 mM Tris-HCl pH 7.1 (A) et 20 mM Tris-HCl + 2 M NaCl pH 7.1 (B)) en 4 volumes de colonnes, à un débit de 2.5 ml/min. Le gradient de 100% B a été conservé pendant 1 volume de colonne afin de s'assurer de l'élution complète de l'albumine. Le détecteur UV a permis d'identifier et de récolter les fractions contenant l'albumine à des longueurs d'onde de 214 nm et 280 nm. Les fractions d'intérêt ont ensuite été lavées et concentrées au moyen d'un système de filtration Amicon Ultra-15 30 KDa (Millipore). Un test BCA (acide bicinchoninique) a été effectué sur le produit final afin d'en évaluer le contenu protéique.

La conjugaison consistait à incuber *in vitro* à 37 °C pendant 30 minutes un peptide DAC™ en présence d'albumines humaine ou de rat purifiées. Une fois l'incubation terminée, le conjugué pré-formé a dû être purifié afin d'obtenir seulement la fraction peptide-albumine. La purification a été effectuée au moyen du système FPLC ÄKTApurifier, mais une colonne à interactions hydrophobiques butyle 50 ml (1.6 cm x 25 cm) (Amersham Biosciences) a été utilisée. Le gradient d'élution était de 0-100% B (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 5 mM caprylate + 750 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0 (A) et 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 5 mM caprylate, pH 7.0 (B)) sur 4 volumes de colonne à un débit de 2.5 ml/min. Le gradient a aussi été conservé pour 1 volume de colonne pour permettre l'élution complète du conjugué. Le détecteur UV a permis d'identifier et de récolter les fractions contenant le conjugué à des longueurs d'onde de 214 nm et 280 nm. Les fractions d'intérêt ont ensuite été lavées et concentrées au moyen d'un système de filtration Amicon Ultra-15 30 KDa (Millipore). Un test BCA (acide bicinchoninique) a été effectué sur le produit final afin d'en évaluer le contenu protéique.

La pureté des conjugués pré-formés a été évaluée par HPLC en phase inverse et leur identité confirmée au moyen d'un spectromètre de masse (Hewlett Packard

LCMS-1100). L'électrophorèse SDS-Page sur gel de polyacrylamide 8% en condition non réductrice a été effectuée avec un échantillon du conjugué contenant 10 µg de protéines. Cette étape consiste à faire migrer les échantillons, préalablement dénaturés à 100°C, selon leur poids moléculaire. Une fois la migration terminée, le gel a été coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les bandes protéiques ayant migré. Le même gel, s'il n'est pas coloré, est utilisé pour effectuer un transfert Western Blot, suivi d'une immunodétection par des anticorps spécifiques. Le transfert Western Blot a été effectué pendant 1 heure et demie sur une membrane de pure nitrocellulose Protran (VWR Canlab). Une fois les protéines transférées, la membrane a été colorée au rouge de Ponceau pour s'assurer de l'efficacité du transfert. Ensuite, la membrane a été saturée avec une solution de lait 5% pendant toute la nuit. L'étape d'immunodétection a permis de révéler une bande correspondant au conjugué albumine-exendin ou une bande d'albumine seulement. Pour révéler la présence du conjugué exendin-4, la membrane saturée a été incubée en présence d'un premier anticorps (*rabbit anti-exendin-4*, 1:100 000; Biophage) pendant une période de 90 minutes à température pièce. Ensuite, le premier anticorps a été détecté par un second anticorps marqué à la peroxydase (*peroxidase conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG*, 1:100 000; Jackson Immunoresearch) pendant 1 heure à température pièce. Les bandes ont été visualisées par un processus de chemiluminescence (*super signal west pico substrate*; MJS Biolynx Inc.) et une exposition sur film (*Hyperfilm*; Amersham Biosciences) qui par la suite a été développé avec un appareil Kodak M35A.

Des anticorps spécifiques à l'albumine humaine (*goat anti-human albumin HRP*, 1:250 000; Cedarlane Laboratories) et à l'albumine de rat (*sheep anti-rat albumin HRP*, 1:250 000; Cedarlane Laboratories) ont aussi été utilisés en Western Blot pour détecter les bandes spécifiques de l'albumine et la présence de dimères, s'il y a lieu.

## 2.2 Test oral de tolérance au glucose (OGTT)

Dans un premier temps, des souris femelles obèses et diabétiques C57BLKS/J-m  $+/+$  Lepr<sup>db</sup> (Jackson Laboratory, Maine) âgées de 7-8 semaines et pesant entre 30-35 g ont été utilisées pour l'OGTT. Toutes les souris ont jeûné pendant 12 à 16 heures avant chaque test. Plusieurs contrôles ont été effectués en injectant d'abord, par voie sous-cutanée, du tampon sodium phosphate (PBS) à l'animal suivis, après 5 minutes, 6 h, 12 h ou 24 h, du gavage oral avec une solution de glucose (Sigma) (1.5 mg/g de poids corporel). Une mesure du glucose sanguin a immédiatement été prise, tel que décrit plus loin.

L'injection des différents peptides à des concentrations variant de 10 nmol/kg à 100 nmol/kg, au lieu du PBS, a été réalisée de la même manière. Une goutte de sang, nécessaire pour mesurer le taux de glucose sanguin, a été prélevée par la veine de la queue de chacune des souris. Le glucose sanguin fut mesuré au moyen d'un glucomètre (*Fast Touch Ultra*, Life Scan Canada) aux temps 0, 10, 20, 30, 60, 90 et 120 minutes suivant le gavage au glucose. Chaque groupe expérimental était constitué de 5 souris.

## 2.3 Contrôle de la glycémie par un régime d'injections multiples

La première journée de l'expérimentation, une seule injection sous-cutanée (100 nmol/kg) des peptides à l'étude a été administrée à des souris femelles obèses et diabétiques C57BLKS/J-m  $+/+$  Lepr<sup>db</sup> (Jackson Laboratory, Maine) âgées de 7-8 semaines. Un échantillon sanguin a été récolté par la veine de la queue 5 minutes avant l'administration ainsi que 5 min, 60 min, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h et 72 h suivant l'administration des peptides. Le sang collecté a été analysé à l'aide d'un glucomètre (*Fast Touch Ultra*, Life Scan Canada) au temps mentionnés ci-dessus. Les groupes expérimentaux étaient composés de 5 souris.

Ensuite, les groupes expérimentaux constitués des mêmes animaux ont reçu une injection sous-cutanée (100 nmol/kg) des mêmes peptides à l'étude aux 1<sup>er</sup>, 3<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup>

jours de cette deuxième partie expérimentale impliquant un régime d'injections multiples, à l'exception d'un groupe ayant reçu une injection chaque jour, du 1<sup>er</sup> au 5<sup>e</sup> jour. Un échantillon sanguin a été prélevé par la veine de la queue et analysé pour la glycémie à l'aide d'un glucomètre (*Fast Touch Ultra*, Life Scan Canada) aux temps - 5 minutes, 60 min, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h et 24 h suivant l'injection. La glycémie a aussi été mesurée aux 6<sup>e</sup> jour et 8<sup>e</sup> jour suivant la première injection de cette partie expérimentale. La consommation d'eau et de nourriture a été mesurée durant la totalité de l'expérimentation, c'est-à-dire du début de la partie expérimentale impliquant une seule injection jusqu'à la fin de la partie expérimentale impliquant un régime d'injections multiples.

## 2.4 Évaluation de la production d'insuline

Une fois la partie expérimentale précédente terminée, toutes les souris diabétiques ont été sacrifiées afin de prélever un échantillon sanguin par voie intracardiaque. Le sang a été centrifugé et la fraction plasmatique a été utilisée pour évaluer la production d'insuline. La détermination du taux d'insuline plasmatique a été réalisée au moyen d'un essai EIA commercial (*Rat/Mouse insulin Elisa Kit*, Linco Research). Ce test consistait en un ELISA Sandwich dont le principe de la procédure est basé sur la capture des molécules d'insuline de l'échantillon plasmatique dans les puits d'une microplaque préalablement recouverte d'un anticorps monoclonal (*mouse anti-rat insulin*) et par la suite, de la liaison d'un anticorps anti-insuline polyclonal biotinylé à l'insuline capturée. La plaque a été lavée pour enlever tout ce qui n'était pas lié, pour ensuite être mise en présence d'un enzyme conjugué à la peroxidase qui se lie aux molécules d'anticorps biotinylés immobilisées. La quantification du complexe anticorps-enzyme a été effectué en évaluant l'activité de la peroxidase en présence du substrat 3,3',5,5'-tetraméthylbenzine. L'activité enzymatique a été mesurée par spectrophotométrie selon l'augmentation de l'absorbance à 450 nm. Comme l'augmentation en absorbance est directement proportionnelle à la quantité d'insuline

capturée dans l'échantillon plasmatique, les valeurs peuvent être extrapolées sur une courbe générée dans le même essai avec des standards de référence d'insuline de rat de concentrations connues.

## 2.5 Évaluation de l'efficacité de liaison au récepteur

Des cellules CHO (*chinese hamster ovarian cells*) transfectées avec le récepteur humain du GLP-1 ont été mises en plaque de 12 puits, à raison de 500 000 cellules par puits, en présence d'un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) faible en glucose contenant 1% d'antibiotique Pen-Strep, 25 mM de tampon HEPES, 50 mM de bicarbonate de sodium et 10% de FBS (*fœtal bovine serum*). Les cellules ont été incubées toute la nuit à 37 °C. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec le tampon de liaison contenant 50 mM tris, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> et 0.5% BSA (*bovine serum albumin*). Ensuite, le peptide non radioactif a été ajouté à des concentrations de 10<sup>-5</sup> M à 10<sup>-13</sup> M, suivi de 50 000 cpm du ligand radioactif I<sup>125</sup>-GLP-1. Le tout a été incubé pendant 2 heures à 4 °C. Une fois l'incubation terminée, la plaque a été lavée avec un milieu RPMI contenant 4% de BSA. Une solution de NaOH 0.5 M a été ajoutée dans tous les puits afin de faire décoller les cellules. Après 10 minutes d'incubation, le surnageant a été récupéré et transféré dans des tubes dont la radioactivité a été comptée avec un compteur gamma. Cet essai a été effectué trois fois pour chaque peptide à l'étude.

## 2.6 Pharmacocinétique *in vivo*

Le modèle animal utilisé pour cette section de la partie expérimentale a été le rat mâle Sprague Dawley (SD), d'un poids de 300-350 g. Chaque groupe expérimental comportait quatre animaux attribués de façon aléatoire. Les DAC<sup>TM</sup> GLP-1, l'exendin-4, ainsi que ses dérivés ont été préalablement dissous dans de la saline, puis administrés par voie intraveineuse (100 nmol/kg) et par voie sous-cutanée (500 nmol/kg). Des échantillons sanguins ont été prélevés à des temps déterminés, soit un

prélèvement avant l'administration des composés, puis à 5 min, 30 min, 60 min, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h. Les échantillons sanguins ont été récoltés dans des tubes contenant de l'EDTA et un inhibiteur de DPP IV (10 µl par ml de sang, Linco Research Inc.). Les tubes ont été centrifugés afin d'obtenir la fraction plasmatique, qui a été congelée à -80°C jusqu'au moment de la détermination du profil pharmacocinétique des peptides injectés. Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés à l'aide du programme WinNolin.

## 2.7 Dosage immunoradioactif

La détermination de la concentration plasmatique des peptides injectés lors de la partie expérimentale de pharmacocinétique *in vivo* (section 2.6) a été effectuée par un dosage RIA. Cette procédure consiste à incuber une concentration fixe d'antigènes (GLP-1 ou exendin-4) radiomarqués avec une quantité constante d'antisérum (contre le GLP-1 ou l'exendin-4), la concentration des sites de liaison de l'antigène sur l'anticorps étant limitée. Si l'antigène non marqué est ajouté à ce système, il y aura compétition entre le traceur marqué et l'antigène non marqué pour les sites limités et constants de l'anticorps. La quantité du traceur lié à l'anticorps va donc diminuer comme la concentration d'antigène non marqué va augmenter. Ceci peut être mesuré après la séparation du complexe lié à l'anticorps du traceur libre. Il est possible de compter la fraction liée en passant les tubes sur un compteur gamma. La concentration en peptide de l'échantillon plasmatique analysé peut être calculée à partir d'une courbe standard générée à partir d'une concentration croissante connue du peptide présent dans l'échantillon.

## 2.8 Électrophorèse et Western Blot

Les échantillons plasmatiques obtenus lors de la partie expérimentale de pharmacocinétique *in vivo* ont été utilisés pour la détection en Western Blot. La concentration protéique des échantillons étant inconnue, des dilutions variant de 1/2 à



1/10 ont été utilisées pour la migration sur un gel de polyacrylamide 8% contenant du SDS. Une fois les protéines migrées, le gel a été transféré sur une membrane de pure nitrocellulose Protran (VWR Canlab). Les protéines transférées ont été visualisées en colorant la membrane au rouge de Ponceau et les bandes immunoréactives ont été détectées en utilisant des anticorps spécifiques.

La membrane a été saturée avec un tampon TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) contenant 5% (p/v) de lait pendant toute la nuit à 4°C. L'anticorps primaire (*rabbit anti-exendin-4*, 1:50 000; Biophage) dilué dans le tampon TBS contenant 1% de plasma de rat a été incubé avec la membrane pendant une heure et demie à la température de la pièce. La membrane a été lavée plusieurs fois avec le tampon TBS 0.05% Tween 20. Ensuite, l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase (*peroxidase conjugated affinipure goat anti-rat IgG*, 1:100 000; Jackson Immunoresearch) a été incubé avec la membrane une heure à la température de la pièce. L'excès d'anticorps a été lavé de la membrane avec le tampon TBS 0.05% Tween 20 avant l'incubation pendant 5 minutes dans le substrat Pico (*super signal west pico substrate*; MJS Biolynx Inc.). La membrane a été immédiatement exposée à un film photographique (*Hyperfilm*; Amersham Biosciences) qui a été par la suite développé grâce à un appareil Kodak M35A.

## 2.9 Évaluation de l'immunogénicité

Le potentiel immunogénique de l'exendin-4 et de ses dérivés a été évalué chez le rat mâle Sprague Dawley. L'étude a été divisée en trois parties expérimentales, soit une phase thérapeutique, une première phase d'immunisation et une deuxième phase d'immunisation. Chaque groupe était composé de 4 rats.

La phase thérapeutique a consisté à injecter, par voie sous-cutanée, 3 µg d'agent actif/jour/rat, pendant 28 jours, un des composés suivants, soit RSA, HSA, RSA:1134, HSA:1134, CJC-1132 ou CJC-1134. Ensuite, les rats ont été injectés, à raison d'une fois par semaine pendant 6 semaines, avec la dose initiale. Des



prélèvements sanguins par la veine jugulaire ont été effectués à intervalles réguliers, selon le calendrier des injections et des prélèvements schématisé à la figure 2.2. Les échantillons sanguins, une fois coagulés, ont été centrifugés afin de récupérer la fraction sérique. Les échantillons de sérum ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse de ces derniers pour la détection d'anticorps.

La première phase d'immunisation a été réalisée en injectant, par voie sous-cutanée, une émulsion contenant soit RSA, HSA, RSA:1134, HSA:1134, CJC-1132 ou CJC-1134 avec l'adjuvant TiterMax Gold (Cederlane Laboratories Limited), selon un ratio 1:1. Chaque dose contenait  $50\text{ }\mu\text{g}$  du composé à tester et a été injectée à deux sites différents dans la région lombaire du rat. Les injections et les prélèvements sanguins ont été effectués selon le calendrier schématisé à la figure 2.3. Les échantillons sanguins, une fois coagulés, ont été centrifugés afin de récupérer la fraction sérique. Les échantillons de sérum ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse de ces derniers pour la détection d'anticorps.

La deuxième phase d'immunisation s'est déroulée comme la phase précédente. Par contre, les composés injectés étaient soit RSA:1707, HSA:1707, CJC-1707 ou CJC-1132. Les doses contenues dans les émulsions étaient aussi différentes, c'est-à-dire  $50\text{ }\mu\text{g}$  pour RSA:1707, HSA:1707 et CJC-1707, puis  $5\text{ }\mu\text{g}$  pour CJC-1707 et CJC-1132. Le TiterMax Gold a aussi été utilisé comme adjuvant. Les injections et les prélèvements sanguins ont été effectués selon le calendrier schématisé à la figure 2.3. Les échantillons sanguins, une fois coagulés, ont été centrifugés afin de récupérer la fraction sérique. Les échantillons de sérum ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse de ces derniers pour la détection d'anticorps.

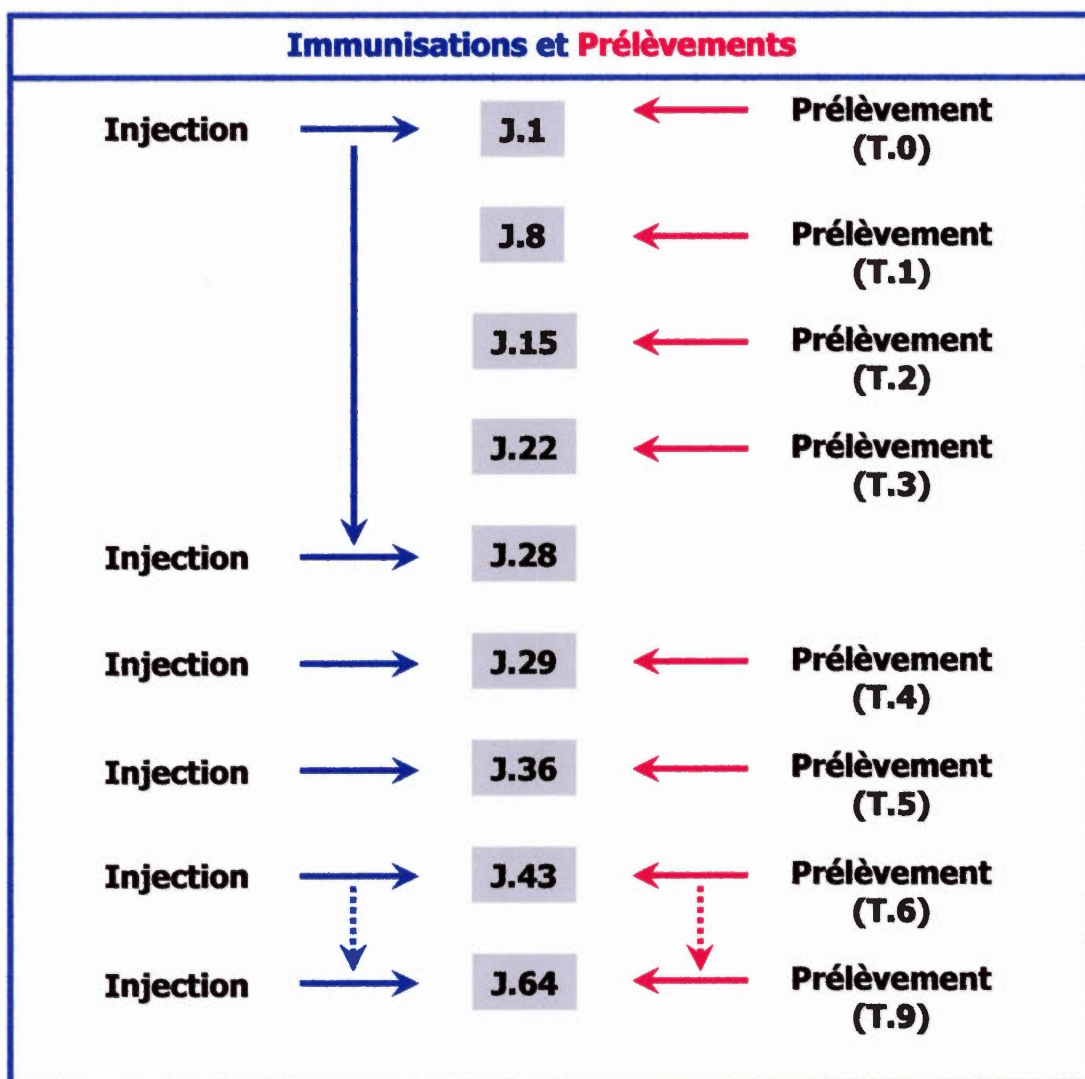
Les signes cliniques ont été vérifiés fréquemment pour s'assurer qu'aucun rat ne subisse une réaction trop sévère suite à l'injection des composés.

## 2.10 Dosage immunoenzymatique

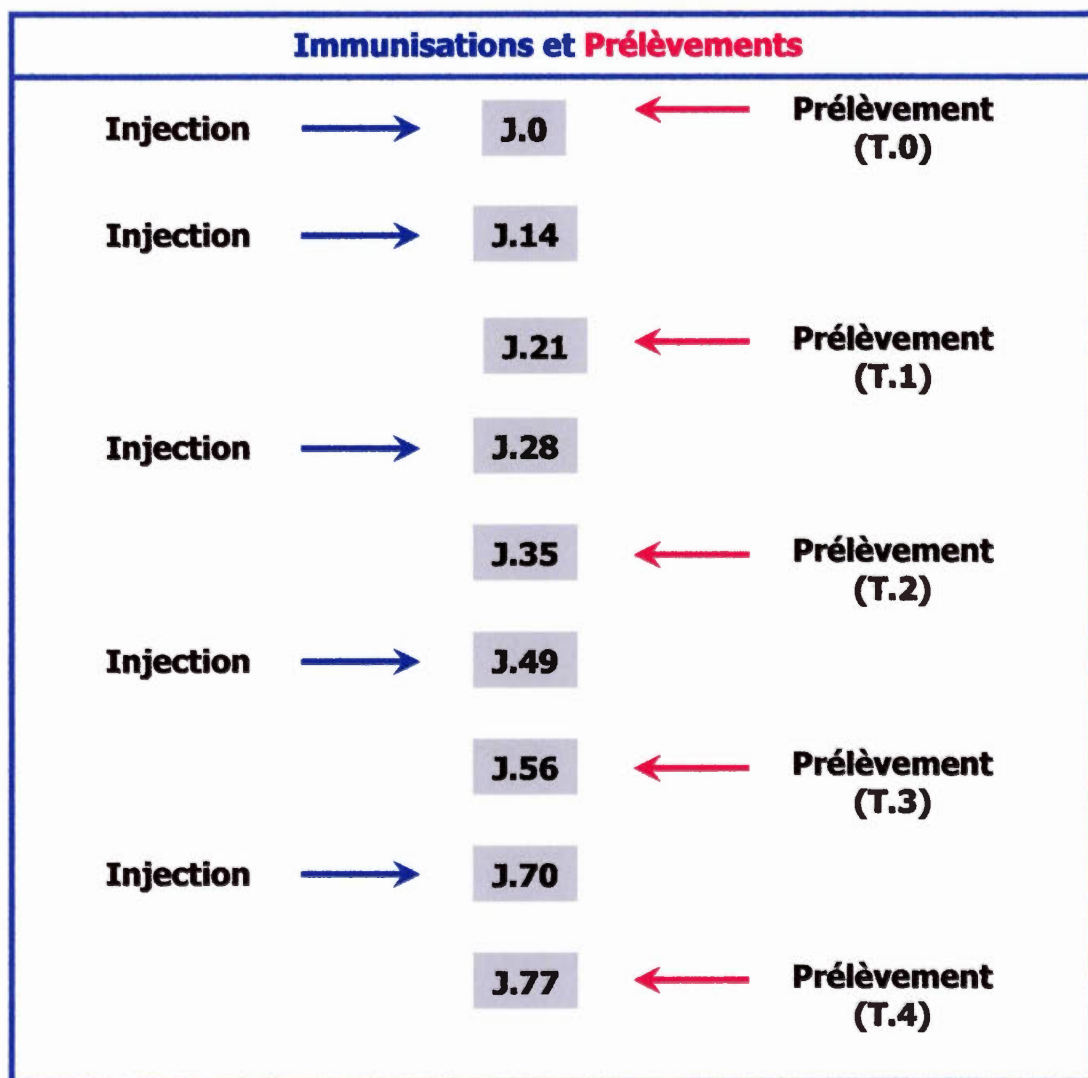
Le titre d'anticorps des échantillons sériques obtenus lors de l'étude d'immunogénicité a été évalué par EIA. Une microplaque de 96 puits de type NUNC immuno-maxisorp (VWR Canlab) a été recouverte avec un antigène (un des mêmes composés injectés lors de l'étude d'immunogénicité) à une concentration de 750 ng par puits, dans un tampon PBS pH 7.4. La plaque a été incubée toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, une fois la plaque lavée au PBS 0.05% Tween 20, une solution de PBS à 1% en BSA a été ajoutée dans chaque puits afin de saturer la plaque pendant une période de deux heures. Ensuite, la plaque a été incubée pendant une heure à la température de la pièce avec une série de dilutions du premier anticorps (sérum prélevé lors de l'étude d'immunogénicité). Après une série de lavages au PBS à 0.05% en Tween 20, la plaque a été incubée pendant une heure à la température de la pièce avec le deuxième anticorps (*peroxidase conjugated affinipure goat anti-rat IgG*, Jackson ImmunoResearch) dilué à 1/10 000. L'incubation terminée, la plaque a été lavée et une solution de *o*-phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich) à 0.5 mg/ml a été ajoutée pour la révélation pendant une période de 10 minutes. La réaction a été arrêtée avec une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N et la plaque a été lue au spectrophotomètre pour l'obtention des densités optiques à 492 nm (figure 2.4).

## 2.11 Éthique et analyses statistiques

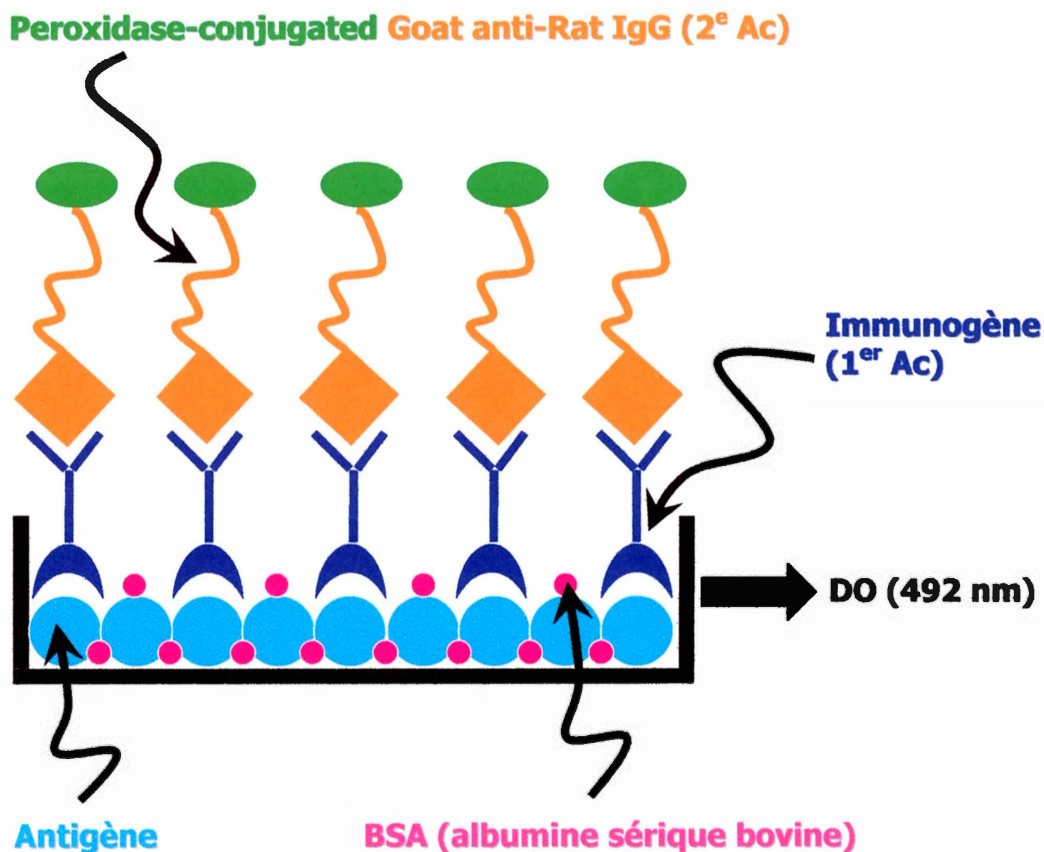
Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne  $\pm$  la moyenne des erreurs standards (SEM) obtenus à partir des programmes GraphPad Prism et Microsoft Excel. L'analyse statistique des différences significatives a été faite selon le test T de Student. Les protocoles expérimentaux utilisant des animaux ont été exécutés en accord avec le Conseil canadien de protection des animaux suite à l'approbation du comité de protection des animaux de l'Université du Québec à Montréal.



**Figure 2.2** Schéma détaillé des injections et des prélèvements de la phase thérapeutique de l'étude d'immunogénicité.



**Figure 2.3** Schéma détaillé des injections et des prélèvements de la première et deuxième phase de l'étude d'immunogénicité.



**Figure 2.4** Illustration du dosage immunoenzymatique (EIA) dans la détermination du titre d'anticorps des études d'immunogénicité. Une dilution du sérum contenant les anticorps (immunogène) produits lors de l'immunisation est mise en présence de l'antigène. L'albumine sérique bovine sert à bloquer les sites libres restants. Un deuxième anticorps est ajouté et la détection est effectuée à 492 nm pour obtenir le titre d'anticorps.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Synthèse des différents peptides et dérivés à l'étude

Dans le cadre de ce projet d'étude, plusieurs peptides, DAC<sup>TM</sup> et conjugués ont été synthétisés et purifiés. Chaque peptide et dérivé a été identifié par un code, facilitant ainsi la nomenclature. Par exemple, le GLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> libre est identifié comme CJC-1049. Afin de faciliter la lecture des résultats, un schéma détaillé de la structure de tous les peptides, DAC<sup>TM</sup> et conjugués est présenté à la figure 3.1. La structure de base est, soit le GLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> ou l'exendin-4(1-39)-NH<sub>2</sub>, deux peptides libres. Les peptides DAC<sup>TM</sup> ont subi une modification en C-terminal ou en N-terminal afin de permettre l'ajout du groupement MPA qui permet la liaison du peptide à l'albumine. Pour certains peptides DAC<sup>TM</sup>, il y a aussi ajout d'un linker (AEEA) entre la lysine et la molécule de MPA. Les conjugués pré-formés (PC) sont synthétisés *in vitro* en mettant le peptide DAC<sup>TM</sup> en présence d'une source d'albumine humaine (HSA) ou de rat (RSA). Une fois purifié, le PC peut être directement injecté chez l'animal.

#### 3.2 Purification et caractérisation des conjugués pré-formés (PC)

Les étapes de purification et de caractérisation des conjugués pré-formés sont très importantes afin de s'assurer de la qualité des composés produits. Il est essentiel d'obtenir des composés d'une grande pureté afin de pouvoir évaluer l'effet biologique réel. Par exemple, une proportion élevée de peptides libres contenus dans un PC



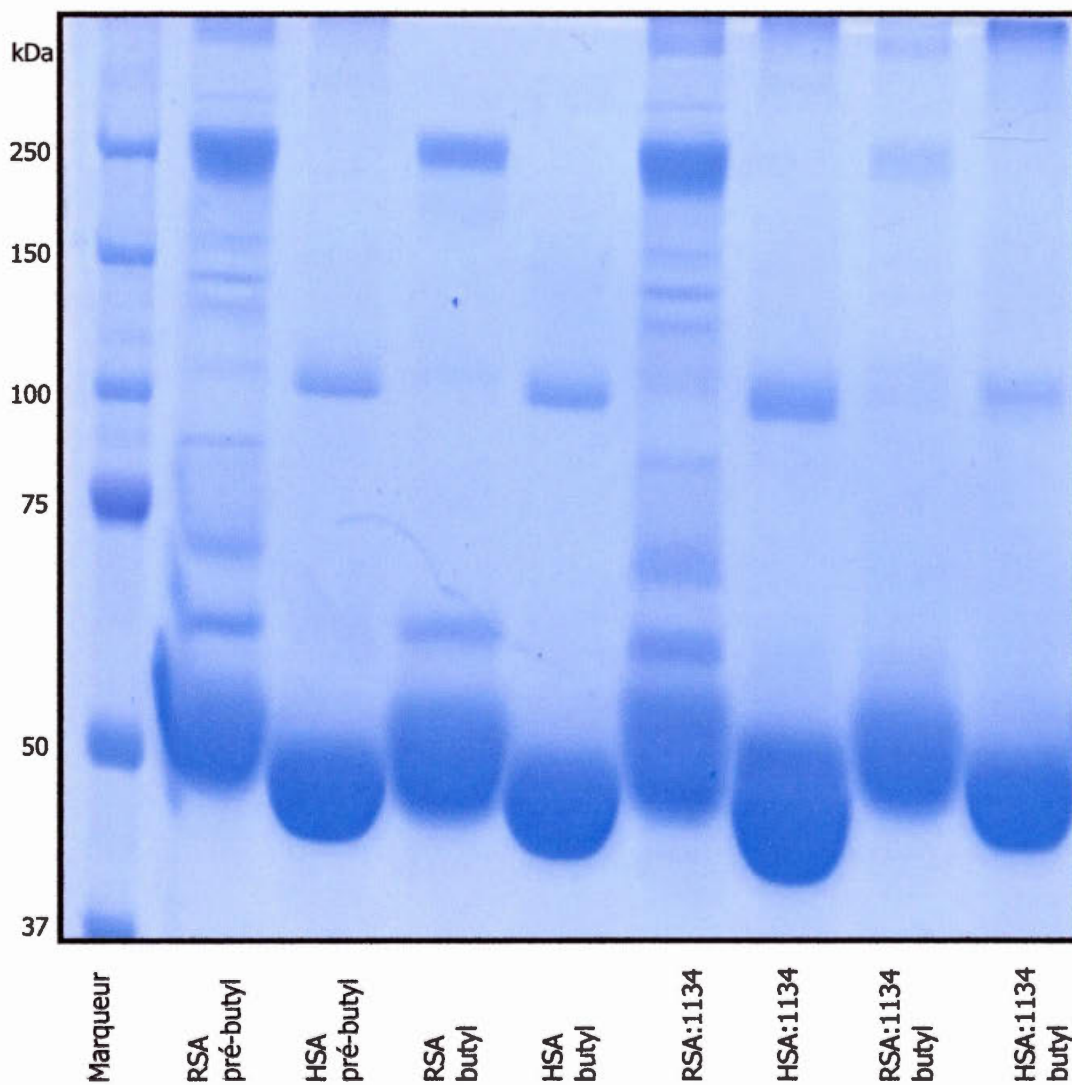
<b>Code Séquence (Nom)</b>	
<b>Peptides libres</b>	
<b>CJC-1049</b>	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH <sub>2</sub> (GLP-1(7-36)-NH <sub>2</sub> )
<b>CJC-1132</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub> (Exendin-4(1-39)-NH <sub>2</sub> )
<b>Peptides DAC™</b>	
<b>CJC-1050</b>	HAEGTFTSDVSSY.....VKGR <b>K(MPA)</b> -NH <sub>2</sub> (GLP-1(7-36)Lys37(MPA)-NH <sub>2</sub> )
<b>CJC-1051</b>	HAEGTFTSDVSSY.....VKGR <b>K(AEEA)<sub>2</sub>(MPA)</b> -NH <sub>2</sub> (GLP-1(7-36)Lys37(AEEA) <sub>2</sub> (MPA)-NH <sub>2</sub> )
<b>CJC-1130</b>	H <b>A</b> EGTFTSDVSSY.....VKGR <b>K(MPA)</b> -NH <sub>2</sub> ((D-Ala8)GLP-1(7-36)Lys37(MPA)-NH <sub>2</sub> )
<b>CJC-1133</b>	HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPSK(MPA)</b> -NH <sub>2</sub> (Exendin-4(1-39)Lys40(MPA)-NH <sub>2</sub> )
<b>CJC-1134</b>	HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPSK(AEEA)(MPA)</b> -NH <sub>2</sub> (Exendin-4(1-39)Lys40(AEEA)(MPA)-NH <sub>2</sub> )
<b>CJC-1554</b>	HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPSK(AEEA)(MPA)</b> -NH <sub>2</sub> (Exendin-4(1-39)Lys40(AEEA)(MPA)-NH <sub>2</sub> quenched)
<b>CJC-1707</b>	<b>(MPA)(AEEA)</b> HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPS</b> -NH <sub>2</sub> ((MPA)(AEEA)Exendin-4(1-39)-NH <sub>2</sub> )
<b>Conjugué pré-formés (PC)</b>	
<b>CJC-1248</b>	H <b>A</b> EGTFTSDVSSY.....VKGR <b>K(AEEA)(MPA)</b> -HSA (PC HSA:1131)
<b>CJC-1249</b>	HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPSK(AEEA)(MPA)</b> -HSA (PC HSA:1134)
<b>CJC-1730</b>	HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPSK(AEEA)(MPA)</b> -RSA (PC RSA:1134)
<b>CJC-1733</b>	<b>HSA-(MPA)(AEEA)</b> HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPS</b> -NH <sub>2</sub> (PC HSA:1707)
<b>CJC-1734</b>	<b>RSA-(MPA)(AEEA)</b> HGEGTFTSDLSKQ..... <b>PPPS</b> -NH <sub>2</sub> (PC RSA:1707)

**Figure 3.1** Code d'identification et structure des peptides et des dérivés à l'étude.

pourrait être responsable d'une partie de l'activité biologique observée lorsqu'injectés chez l'animal ou encore lorsque testés en culture cellulaire. L'effet de la purification peut être clairement observé après la migration sur gel de polyacrylamide 8% des échantillons et la coloration de ces derniers au bleu de Coomassie (figure 3.2). L'albumine de rat a été obtenue par la purification du sérum sur FPLC tandis que l'albumine humaine purifiée provient d'une source commerciale. Afin d'éliminer le maximum d'impuretés, l'albumine de rat et l'albumine humaine ont été passées sur la colonne butyle. L'albumine de rat, dont le poids moléculaire est de 65 880 Da, possède une bande clairement visible au niveau du marqueur à 50 kDa. On peut remarquer une différence significative lorsque l'albumine est passée sur la colonne butyle. Par contre, on conserve une bande de haut poids moléculaire, moindre mais tout de même présente, correspondant aux immunoglobulines G (IgG) qu'il n'est pas possible d'éliminer complètement. Quant à l'albumine humaine, elle était déjà purifiée, de source commerciale et ne comportait pratiquement aucune impureté. La bande présente à 100 kDa correspondait aux dimères d'albumine, c'est-à-dire à une agrégation de deux molécules d'albumine. La conjugaison de l'albumine de rat non purifiée sur butyle avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1134) ne permettait pas d'obtenir uniquement le conjugué pré-formé, puisque qu'une portion de l'albumine possède un résidu de cystéine-34 bloqué ne pouvant lier le DAC<sup>TM</sup>, que l'on désigne comme « l'albumine cappée ». Par contre, la séparation du produit initial sur la colonne butyle permet de récupérer seulement la fraction conjuguée en éliminant pratiquement tous les sous-produits, comme l'albumine libre non liée et l'albumine cappée. De plus, le conjugué pré-formé ne contient presque plus d'IgG une fois purifié. La conjugaison du DAC<sup>TM</sup> à l'albumine humaine permet d'obtenir un conjugué contenant moins de dimères d'albumine.

L'analyse des profils des échantillons envoyés au spectre de masse (figures 3.3 à 3.6) permet de visualiser les niveaux de purification des conjugués pré-formés avant et après leur passage sur la colonne butyle. Les spectres de masse représentant les PC





**Figure 3.2** Profil de purification des conjugués pré-formés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% et suite à la coloration au bleu de Coomassie.

RSA:1134 et HSA:1134 avant leur passage sur la colonne butyle permettent d'évaluer le niveau de conjugaison puisque toutes les molécules d'albumine n'ont pas la capacité de lier le DAC<sup>TM</sup>. On remarquera que le taux de conjugaison à l'albumine de rat est plus élevé que celui à l'albumine humaine (figures 3.3 et 3.4, respectivement). Une fois la purification sur la colonne de butyle effectuée, c'est le conjugué pré-formé qui est retrouvé en abondance majoritaire. Il n'y a plus d'albumine libre ou d'albumine cappée (figures 3.5 et 3.6).

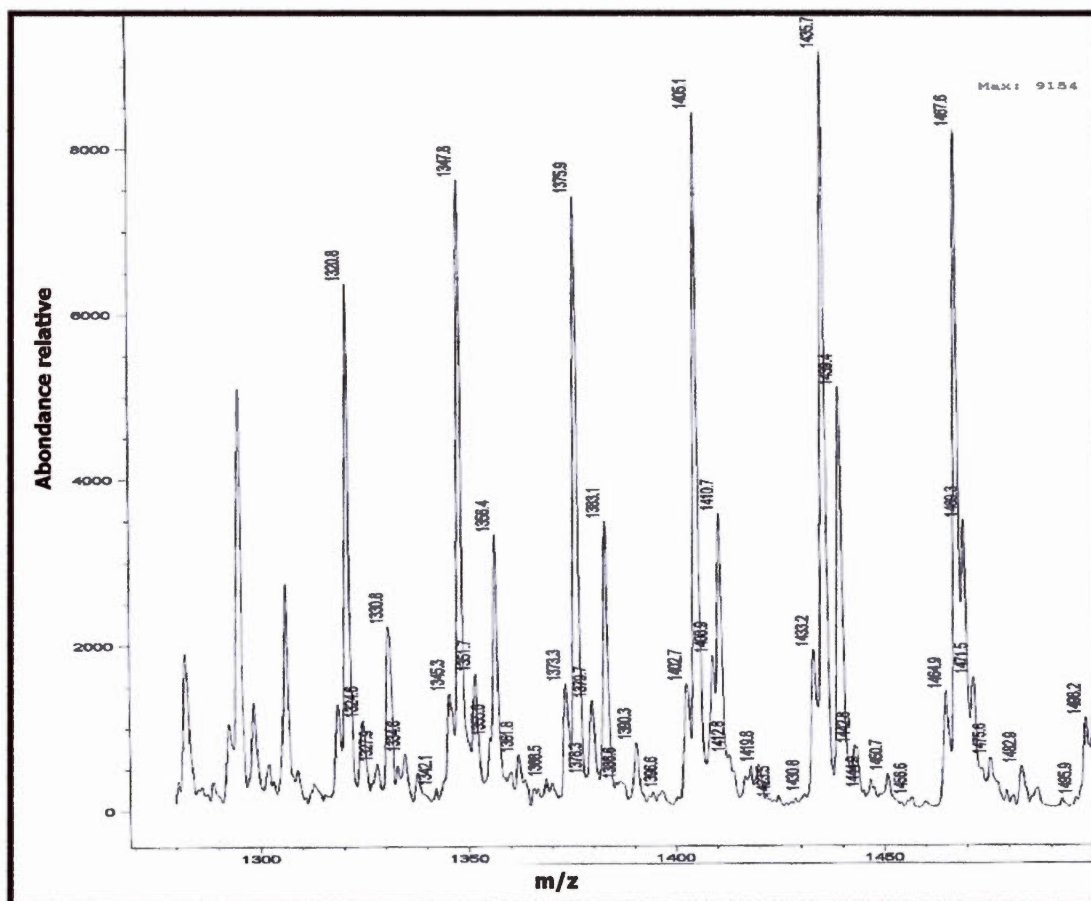
Des échantillons d'albumine de rat, d'albumine humaine et des conjugués pré-formés avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 avant et après purification sur la colonne butyle ont tous été analysés en Western blot (figure 3.7). L'albumine humaine et le PC correspondant possèdent bien une bande distincte lorsque la membrane est révélée avec un anticorps anti-albumine humaine (figure 3.7a). Il en est de même pour l'albumine de rat et son conjugué pré-formé (figure 3.7b). L'exposition de la membrane à un anticorps anti-exendin-4 permet de visualiser seulement les bandes correspondant aux conjugués à l'albumine de rat et celui à l'albumine humaine (figure 3.7c).

### 3.3 Test oral de tolérance au glucose (OGTT) chez la souris diabétique

#### 3.3.1 Profil pharmacodynamique après injection d'une seule dose

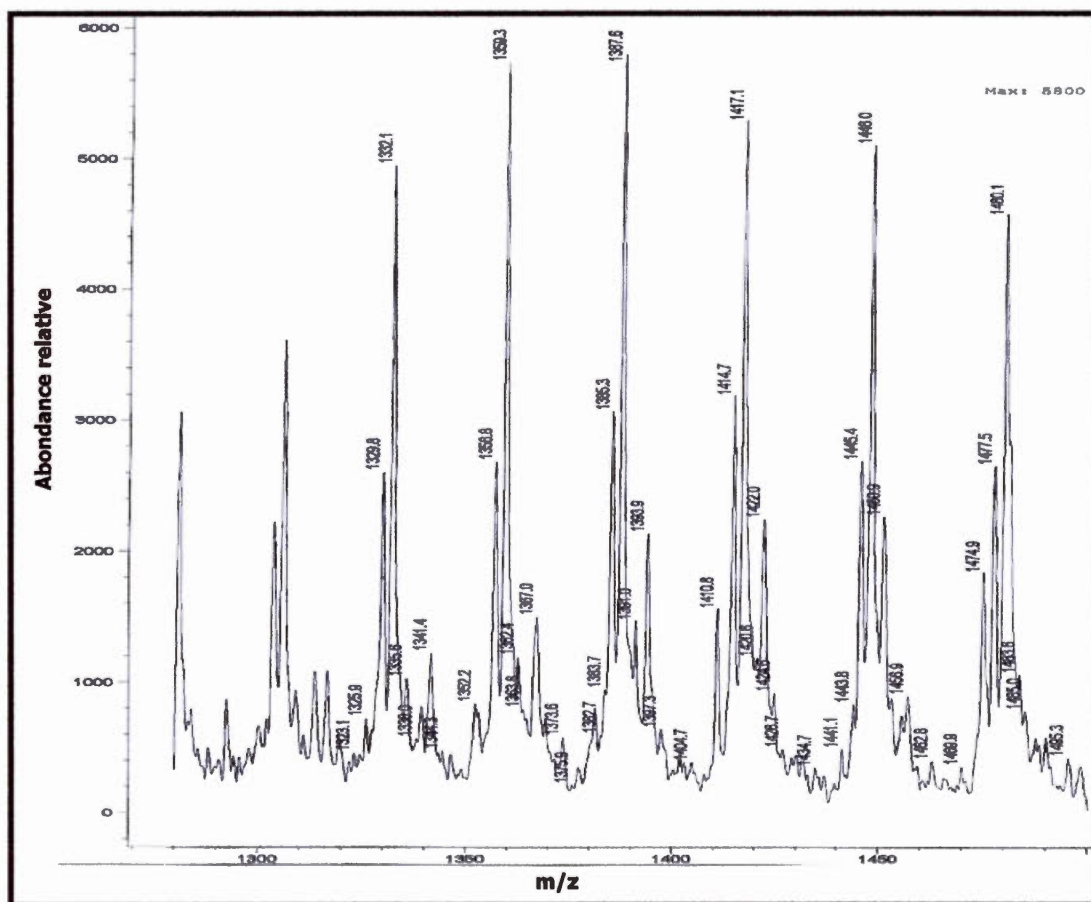
Le potentiel insulinothrompique de l'exendin-4 (CJC-1132), des DAC<sup>TM</sup> correspondants (CJC-1133 et CJC-1134) et des DAC<sup>TM</sup> GLP-1 (CJC-1050, CJC-1051 et CJC-1130) a été évalué chez un modèle de souris diabétiques (C57BLKS/J-m  $+/+$  Lepr<sup>db</sup>) suite à l'injection de ces derniers 5 minutes, 6 h, 12 h et 24 h précédant l'OGTT. Une seule dose a été injectée par voie sous-cutanée, soit 100 nmol/kg.

L'injection de l'exendin-4 et des deux DAC<sup>TM</sup> correspondants, 5 minutes avant l'OGTT, a permis d'obtenir une baisse significative du taux de glucose sanguin



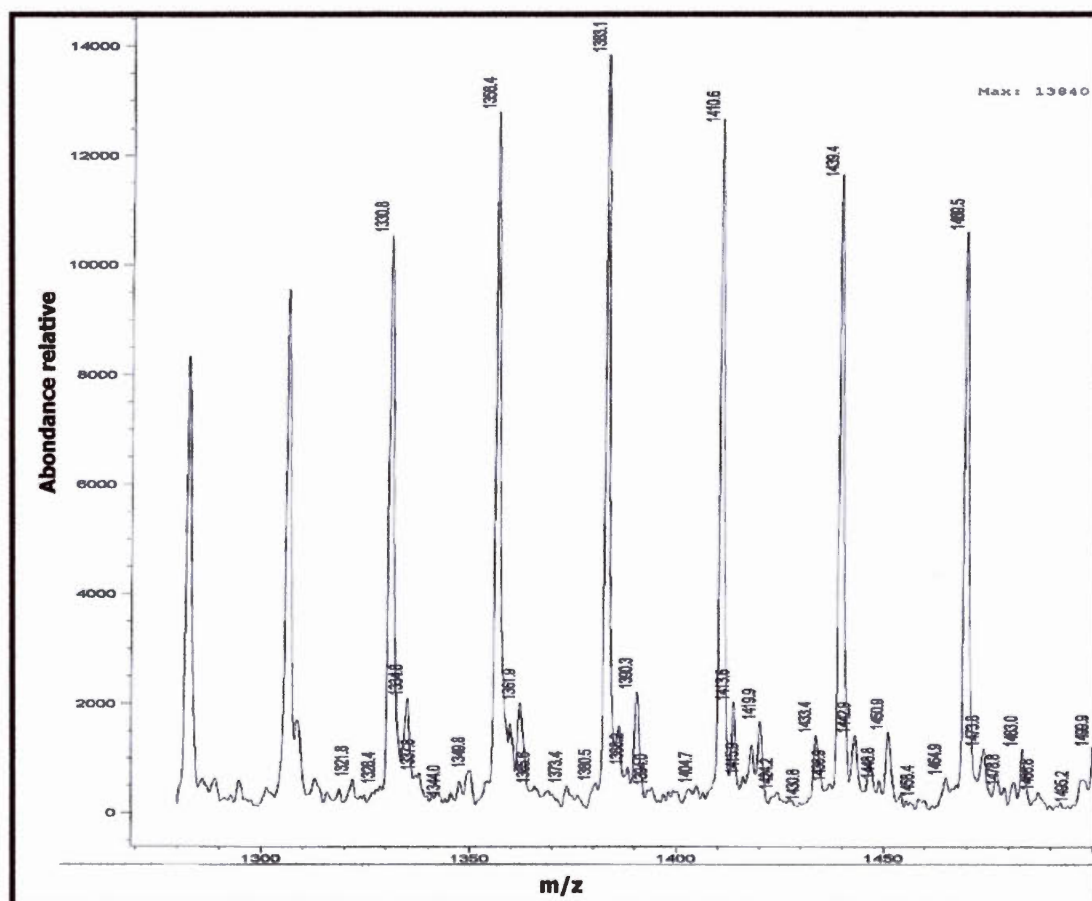
	Poids	Abondance absolue	Abondance relative
A	65994.96	46848	100.0
B	70483.63	21127	45.10
C	66173.13	12439	26.55
D	65883.63	8855	18.90
E	55442.52	1279	2.73

**Figure 3.3** Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine de rat (RSA:1134) avant sa purification sur la colonne butyle. Le poids moléculaire du conjugué est de 70483.63 g/mol et son abondance relative avant purification est de 45.1%.



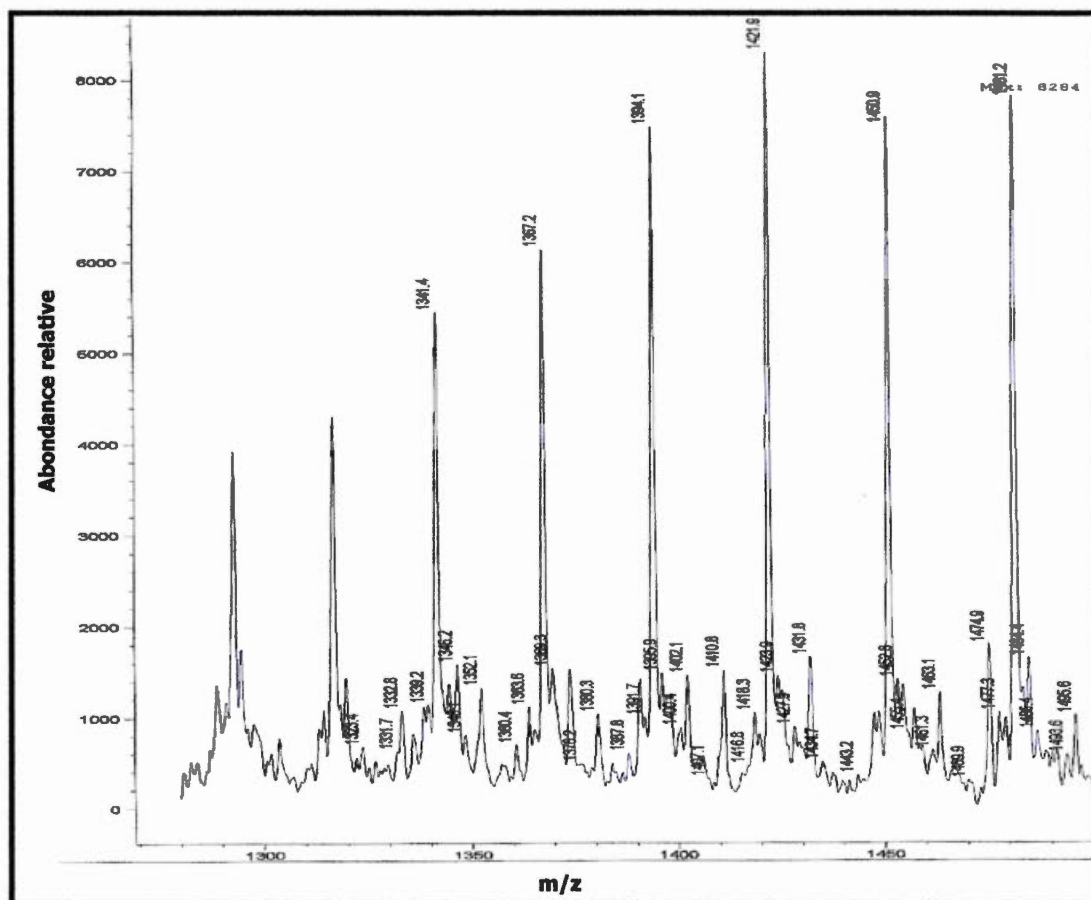
	Poids	Abondance absolue	Abondance relative
A	66557.88	31326	100.00
B	66441.91	16710	53.34
C	71047.23	9166	29.26
D	59460.71	8949	28.57
E	55696.38	7828	24.99
F	66715.70	7783	24.85
G	56642.72	7130	22.76

**Figure 3.4** Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine humaine (HSA:1134) avant sa purification sur la colonne butyle. Le poids moléculaire du conjugué est de 71047.23 g/mol et son abondance relative avant purification est de 29.26%.



	Poids	Abondance absolue	Abondance relative
A	70484.05	71851	100.00
B	62348.92	16973	23.62
C	56663.71	16113	22.43
D	59205.29	13796	19.20
E	66692.54	10586	14.73
F	70643.58	6398	8.90
G	65886.09	3203	4.46

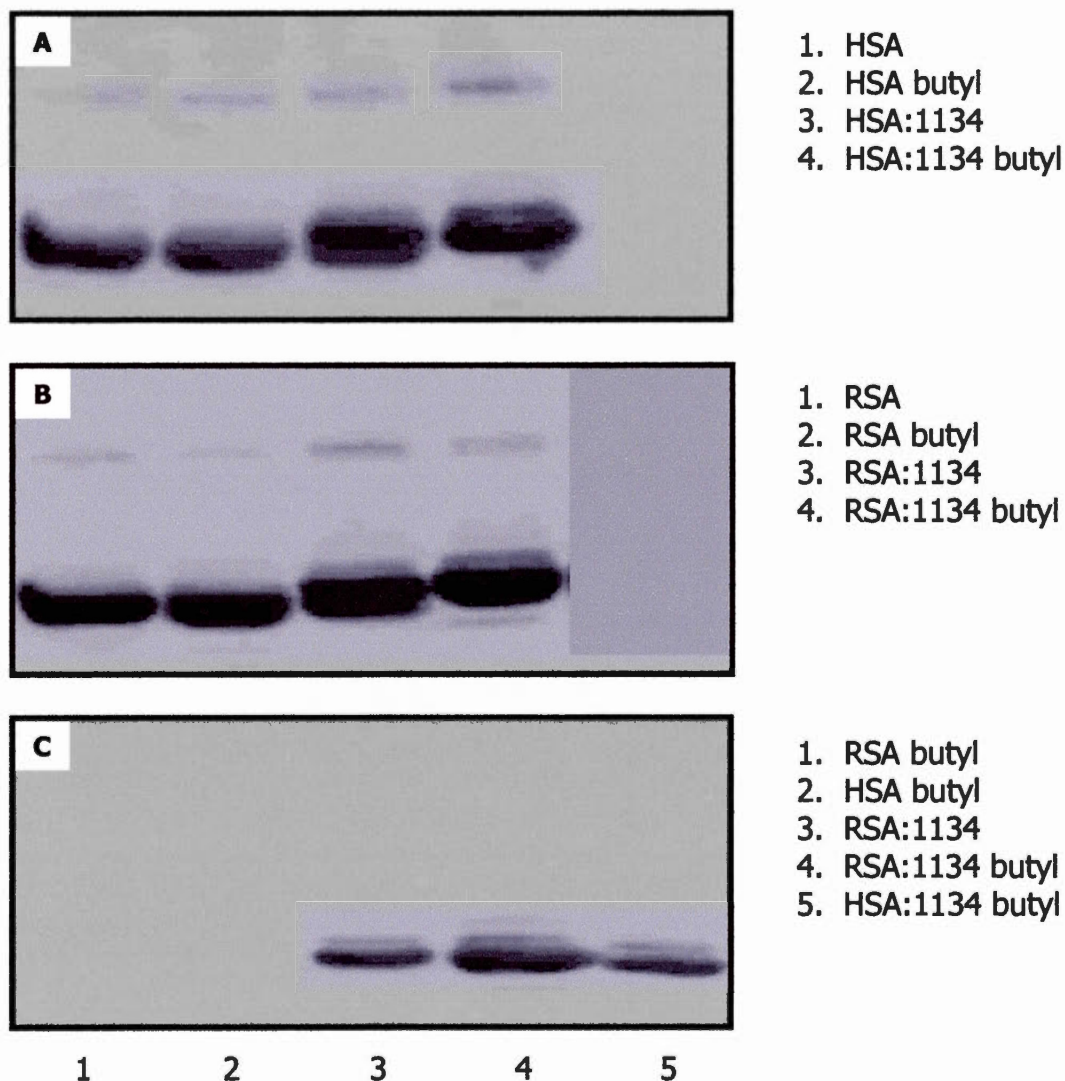
**Figure 3.5** Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine de rat (RSA:1134) après sa purification sur la colonne butyle. Le poids moléculaire du conjugué est de 70484.05 g/mol et son abondance relative après purification est de 100%.



	Poids	Abondance absolue	Abondance relative
A	71046.21	42414	100.00
B	62525.39	11172	26.34
C	64075.98	11014	25.97
D	62849.51	10232	24.12
E	67044.38	8571	20.21
F	67253.53	8433	19.88
G	71142.00	7121	16.79

**Figure 3.6** Profil LC-MS du conjugué exendin-4 à l'albumine humaine (HSA:1134) après sa purification sur la colonne butyle. Le poids moléculaire du conjugué est de 71046.21 g/mol et son abondance relative après purification est de 100%.





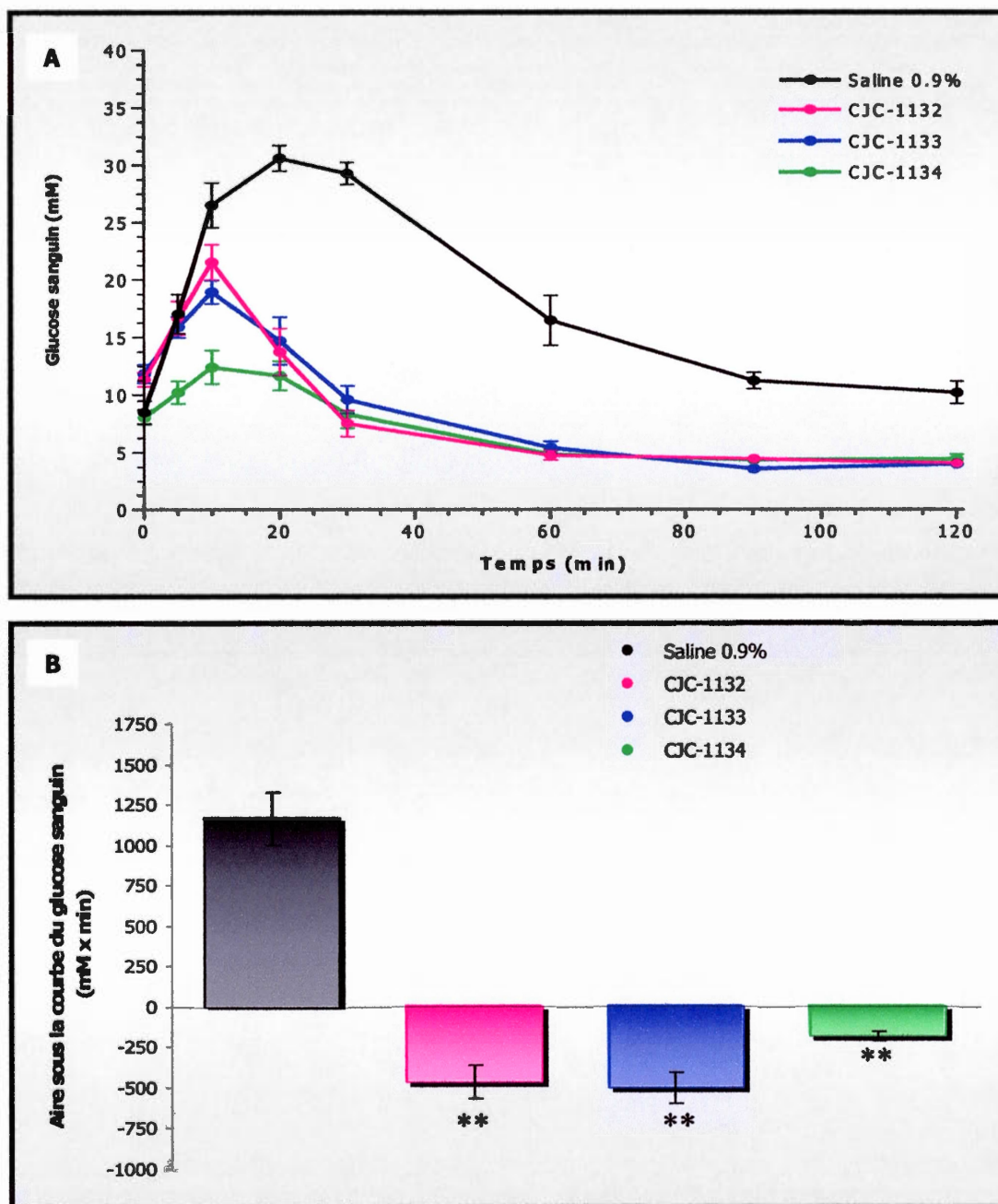
**Figure 3.7** Analyse par Western Blot des échantillons d'albumine de rat (RSA), d'albumine humaine (HSA) et des conjugués pré-formés avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (RSA:1134 et HSA:1134) avant et après purification sur la colonne butyle. (A) L'albumine humaine et le PC correspondant possèdent bien une bande distincte lorsque la membrane est révélée avec un anticorps anti-albumine humaine. (B) Il en est de même avec l'albumine de rat et son conjugué pré-formé qui sont détectés avec un anticorps anti-albumine de rat. (C) L'exposition de la membrane avec un anticorps anti-exendin-4 permet de visualiser seulement les bandes correspondant aux conjugués à l'albumine de rat et celui à l'albumine humaine.



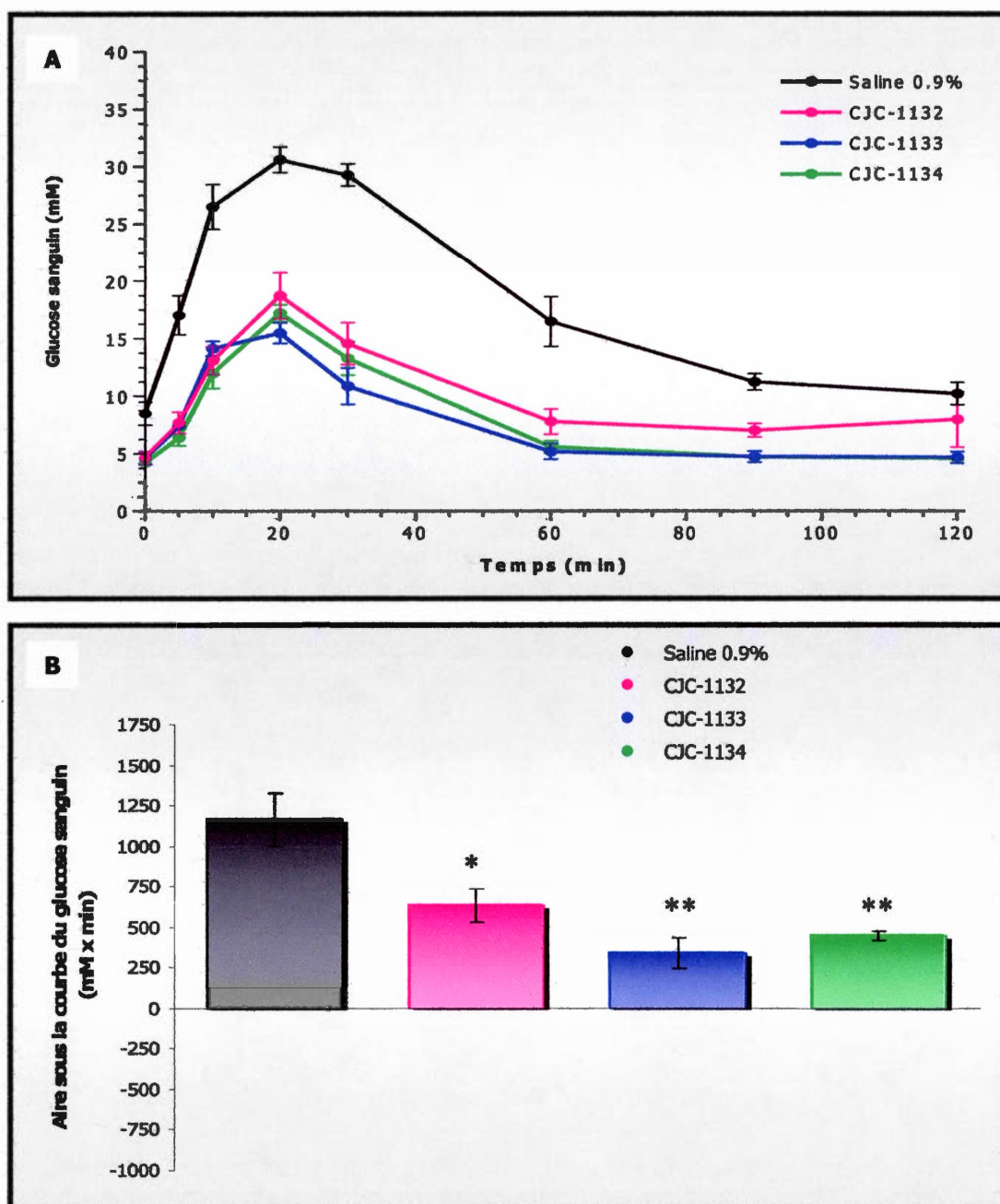
relativement au groupe contrôle, celui-ci ayant été injecté avec de la saline 0.9% (figure 3.8). Même après une période de 120 minutes, la glycémie des souris traitées est demeurée beaucoup plus basse que celle des souris contrôles, qui est revenue à la normale. Ces observations sont appuyées par la représentation de l'aire sous la courbe du glucose sanguin (AUC) démontrant clairement la différence significative entre les groupes traités comparativement au groupe contrôle. Lorsque ces mêmes composés ont été injectés 6 heures avant l'OGTT, on a observé immédiatement l'effet sur la glycémie basale, qui correspond plus à une glycémie de souris normale versus celle observée chez le groupe contrôle (figure 3.9). Pour la période de l'OGTT, les trois composés sont capables de diminuer significativement le taux de glucose sanguin. On remarque que l'effet est soutenu après une période de 120 minutes pour les deux DAC<sup>TM</sup> exendin-4, tandis que l'exendin-4 libre commence à perdre de son potentiel et tend à revenir vers le groupe contrôle.

Le potentiel insulinothypique des deux DAC<sup>TM</sup> GLP-1 (CJC-1050 et CJC-1051) a aussi été testé suite à l'injection sous-cutanée de ces derniers 5 minutes et 6 heures avant l'OGTT (figure 3.10). On observe une diminution significative du taux de glucose sanguin suite à l'injection de 5 minutes. Par contre, au bout de 120 minutes, la glycémie est revenue semblable à celle du groupe contrôle. L'injection de ces composés 6 heures avant l'OGTT ne permet pas de contrôler la glycémie comme le font les DAC<sup>TM</sup> exendin-4. Au contraire, le profil du taux de glucose sanguin est pratiquement le même que celui du groupe contrôle.

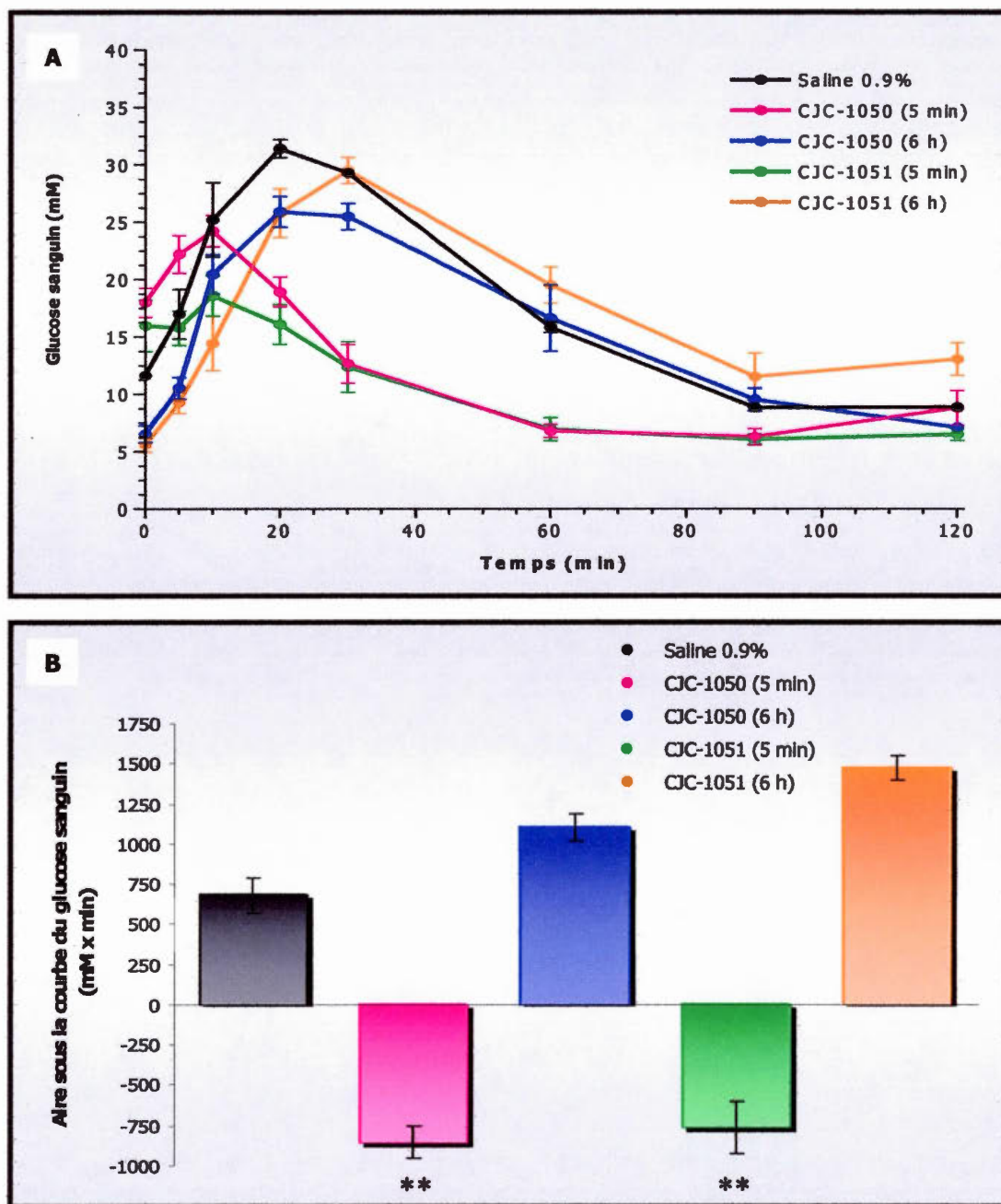
Puisque l'exendin-4 libre et les DAC<sup>TM</sup> exendin-4 manifestaient encore une certaine activité lorsqu'injectés 6 heures avant l'OGTT, l'étude a été poursuivie afin de déterminer s'il était possible d'observer un contrôle de la glycémie lorsque les composés étaient injectés 12 heures et 24 heures avant le test. On peut observer que le potentiel insulinothypique de l'exendin-4 libre ne permet d'exercer qu'un faible contrôle de la glycémie sur une période de 12 heures et l'effet disparaît à 24 heures (figure 3.11). Un effet de plateau est observable pour le groupe contrôle, ce qui est



**Figure 3.8** (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin suite au test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) injectée avec l'exendin-4 libre (CJC-1132), le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 short linker (CJC-1133) et le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 long linker (CJC-1134). Une dose de 100 nmol/kg a été injectée par voie sous-cutanée 5 minutes avant l'OGTT. \*\*  $P < 0.01$ .

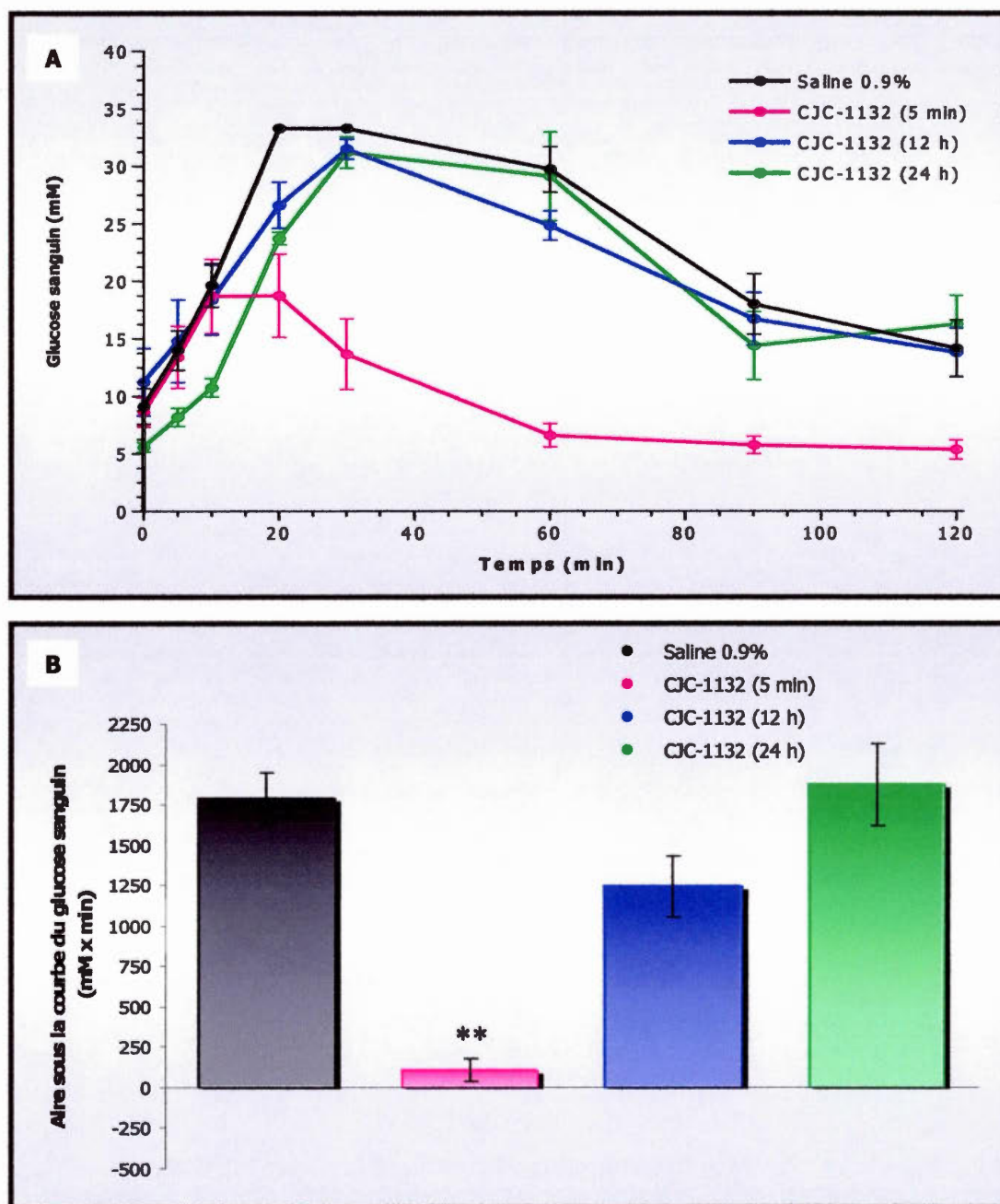


**Figure 3.9** (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin suite au test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M<sup>+/+</sup>Lepr<sup>db</sup>) injectée avec l'exendin-4 libre (CJC-1132), le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 short linker (CJC-1133) et le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 long linker (CJC-1134). Une dose de 100 nmol/kg a été injectée par voie sous-cutanée 6 heures avant l'OGTT. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .



**Figure 3.10** (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin suite au test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M<sup>+/+</sup>Lepr<sup>db</sup>) injectée avec le DAC<sup>TM</sup> GLP-1 short linker (CJC-1050) et le DAC<sup>TM</sup> GLP-1 long linker (CJC-1051). Une dose de 100 nmol/kg a été injectée par voie sous-cutanée 5 minutes et 6 heures avant l'OGTT. \*\*  $P < 0.01$ .



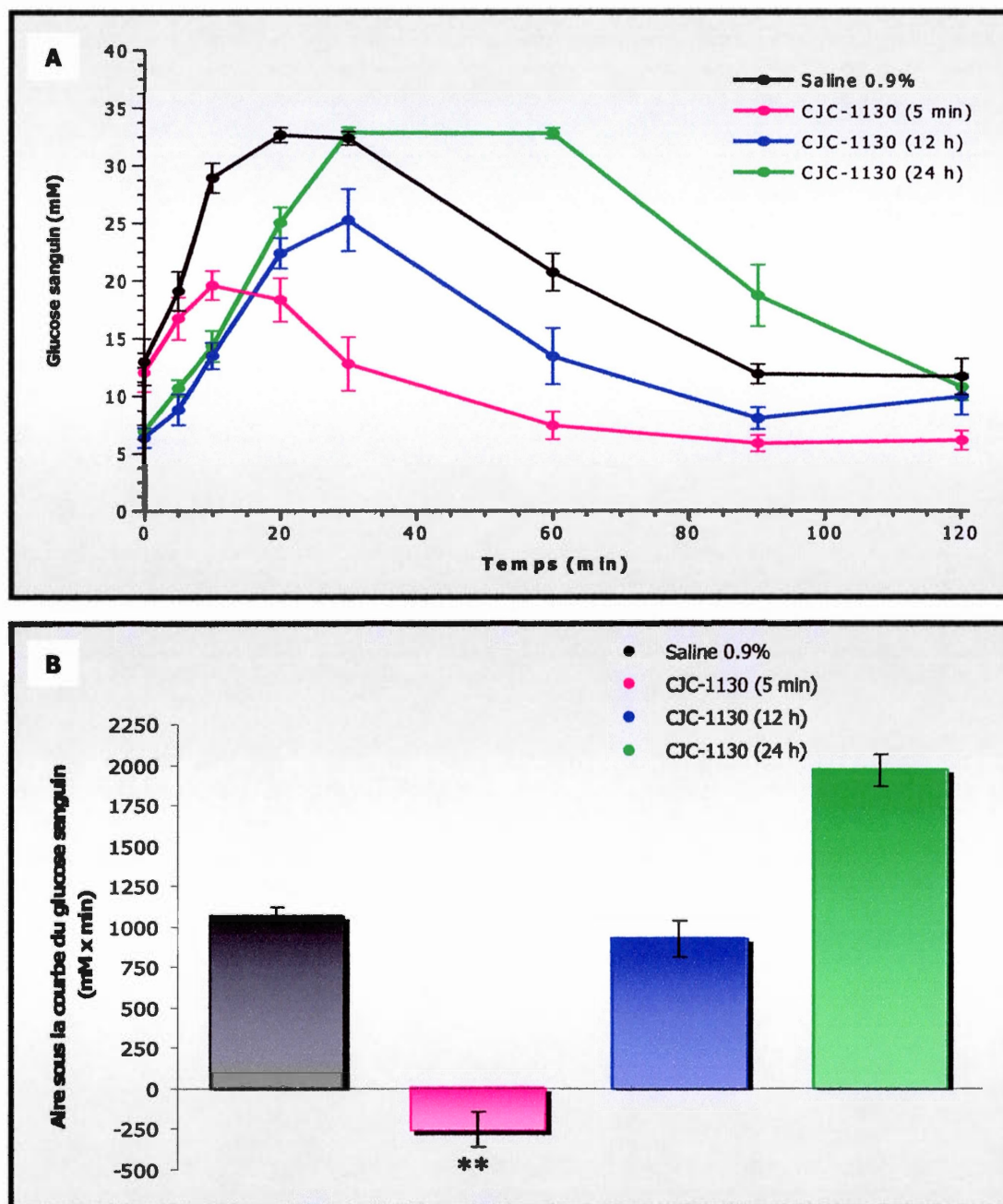


**Figure 3.11** (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin suite au test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M<sup>+/+</sup>Lepr<sup>db</sup>) injectée avec l'exendin-4 libre (CJC-1132). Une dose de 100 nmol/kg a été injectée par voie sous-cutanée 5 minutes, 12 heures et 24 heures avant l'OGTT. \*\*  $P < 0.01$ .

engendré par la limitation de la lecture de l'instrumentation. La différence significative entre le groupe traité 12 heures pré-OGTT et le groupe contrôle pourrait donc être plus importante. Il a été possible d'évaluer l'activité d'un DAC<sup>TM</sup> GLP-1 (CJC-1130) afin de déterminer son potentiel insulinothèque sur une période de 12 et 24 heures (figure 3.12). Au contraire de l'exendin-4 libre, on peut observer une activité lorsque le composé a été injecté 12 heures avant le test, mais il n'y a pas prolongation de l'effet jusqu'à 24 heures. Par contre, on observe une différence significative au niveau de la glycémie basale, en comparaison avec le groupe contrôle. En ce qui concerne les DAC<sup>TM</sup> exendin-4, un seul a été testé sur des périodes de 12 et 24 heures, soit le composé CJC-1133 (figure 3.13). Le potentiel insulinothèque est facilement observable et se prolonge, non seulement jusqu'à 24 heures suivant l'injection, mais il permet aussi, après 120 minutes une fois l'OGTT commencé, de revenir à une glycémie normale en comparaison avec le groupe contrôle. On peut aussi observer un effet sur la glycémie basale pour les groupes à 12 et 24 heures ainsi que le même effet de plateau pour le groupe contrôle.

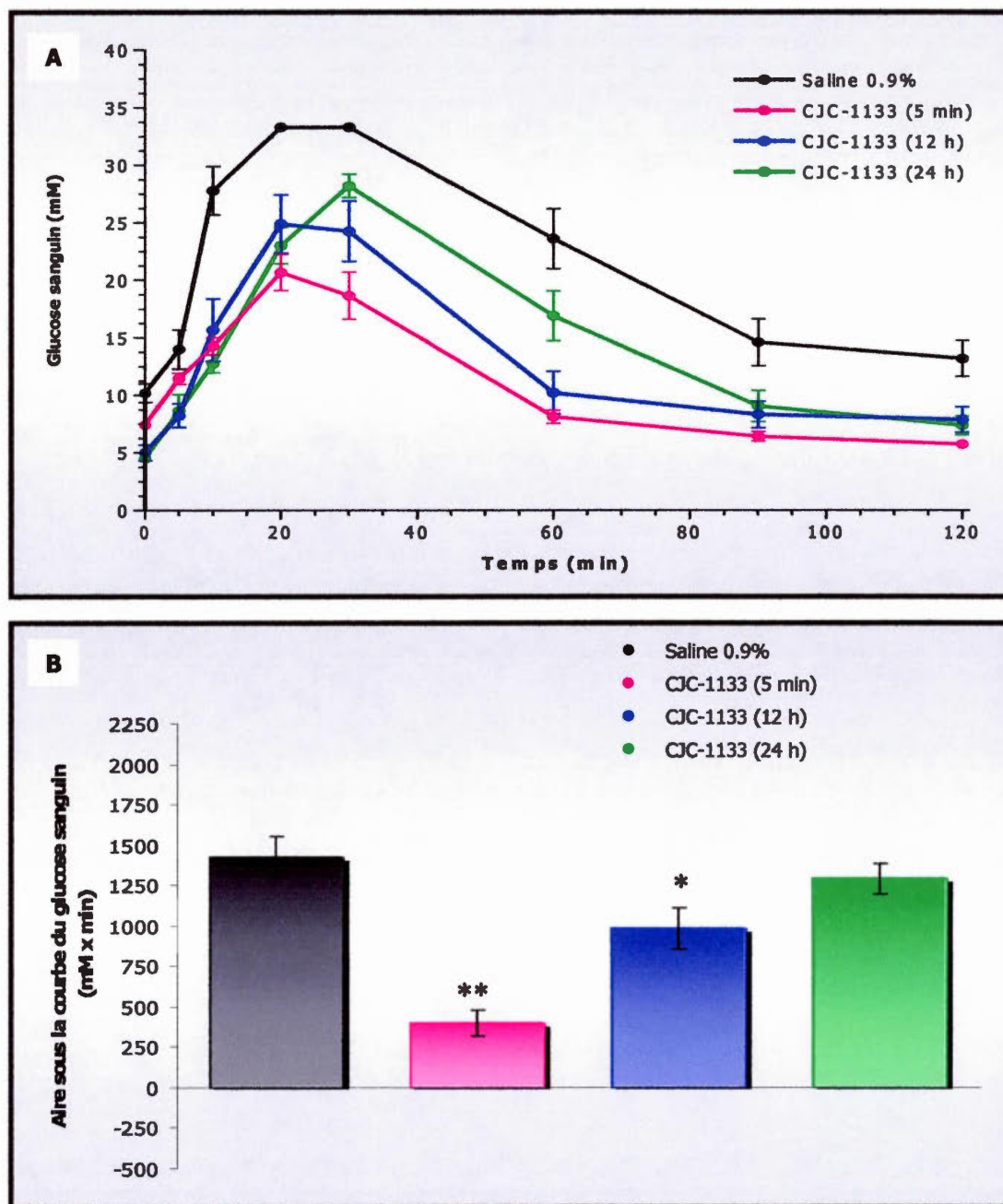
### 3.3.2 Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration

Un profil pharmacodynamique en fonction de la concentration a été établi afin d'évaluer l'effet de l'injection de plusieurs doses du DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1133) sur la réponse glycémique des souris diabétiques, suite au test de tolérance au glucose réalisé 5 minutes, 12 h et 24 h suivant l'injection sous-cutanée. Les doses injectées étaient de l'ordre de 10, 25, 50 et 100 nmol/kg. Lorsque le DAC<sup>TM</sup> est injecté 5 minutes avant l'OGTT, il est possible d'observer l'effet insulinothèque pour toutes les doses injectées, en comparaison avec le groupe contrôle (figure 3.14). Il n'y a pas vraiment de différence significative entre les groupes traités, toutes les doses permettant de diminuer significativement le taux de glucose sanguin. Même après un période de 120 minutes, la glycémie de tous les groupes traités est encore beaucoup plus faible que celle du groupe contrôle. Lorsque le composé a été injecté 12 heures

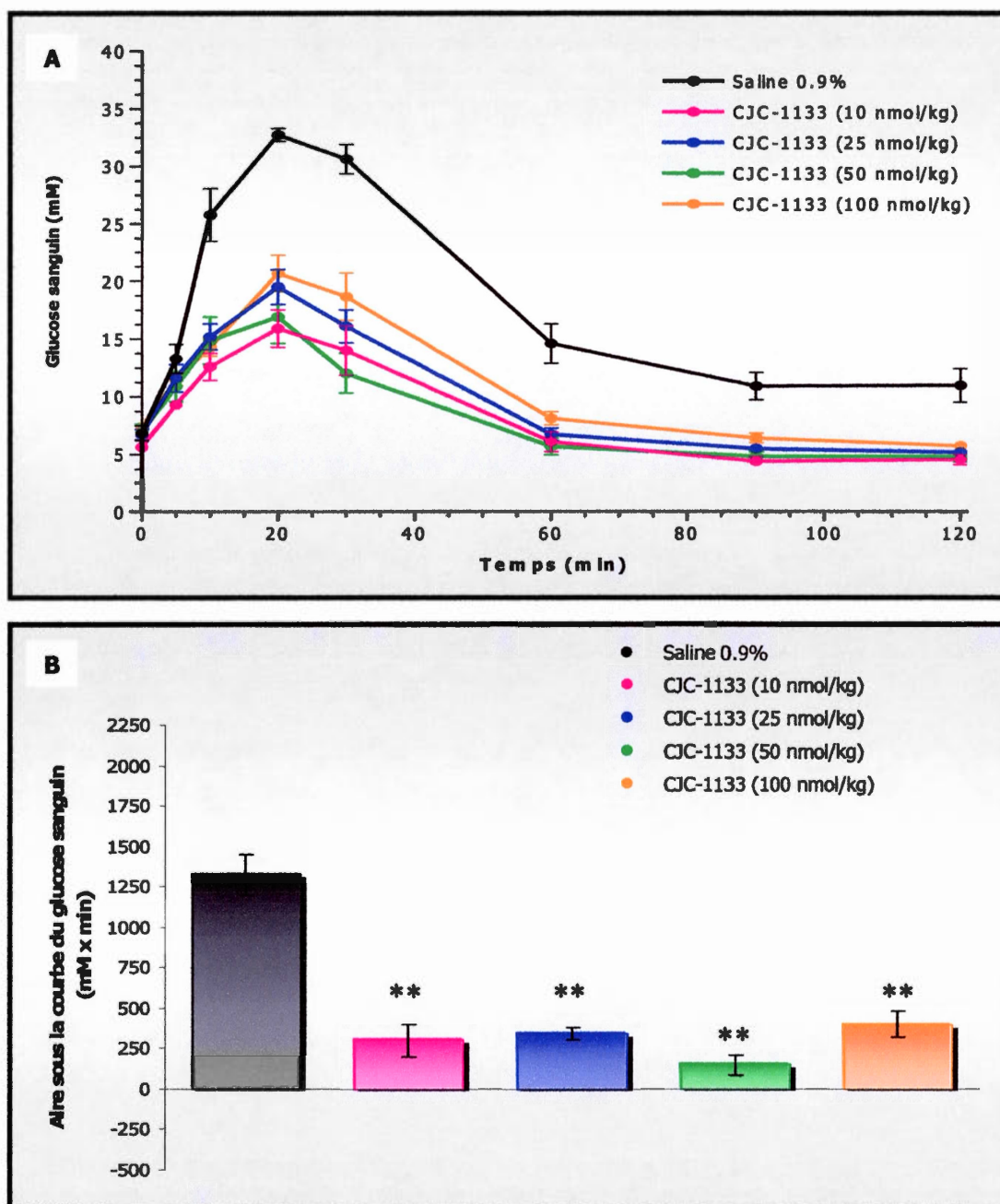


**Figure 3.12** (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin suite au test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) injectée avec le DAC™ GLP-1(dAla<sup>8</sup>) (CJC-1130). Une dose de 100 nmol/kg a été injectée par voie sous-cutanée 5 minutes, 12 heures et 24 heures avant l'OGTT. \*\*  $P < 0.01$ .





**Figure 3.13** (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin suite au test oral de tolérance au glucose chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M<sup>+/+</sup>Lepr<sup>db</sup>) injectée avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1133). Une dose de 100 nmol/kg a été injectée par voie sous-cutanée 5 minutes, 12 heures et 24 heures avant l'OGTT. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

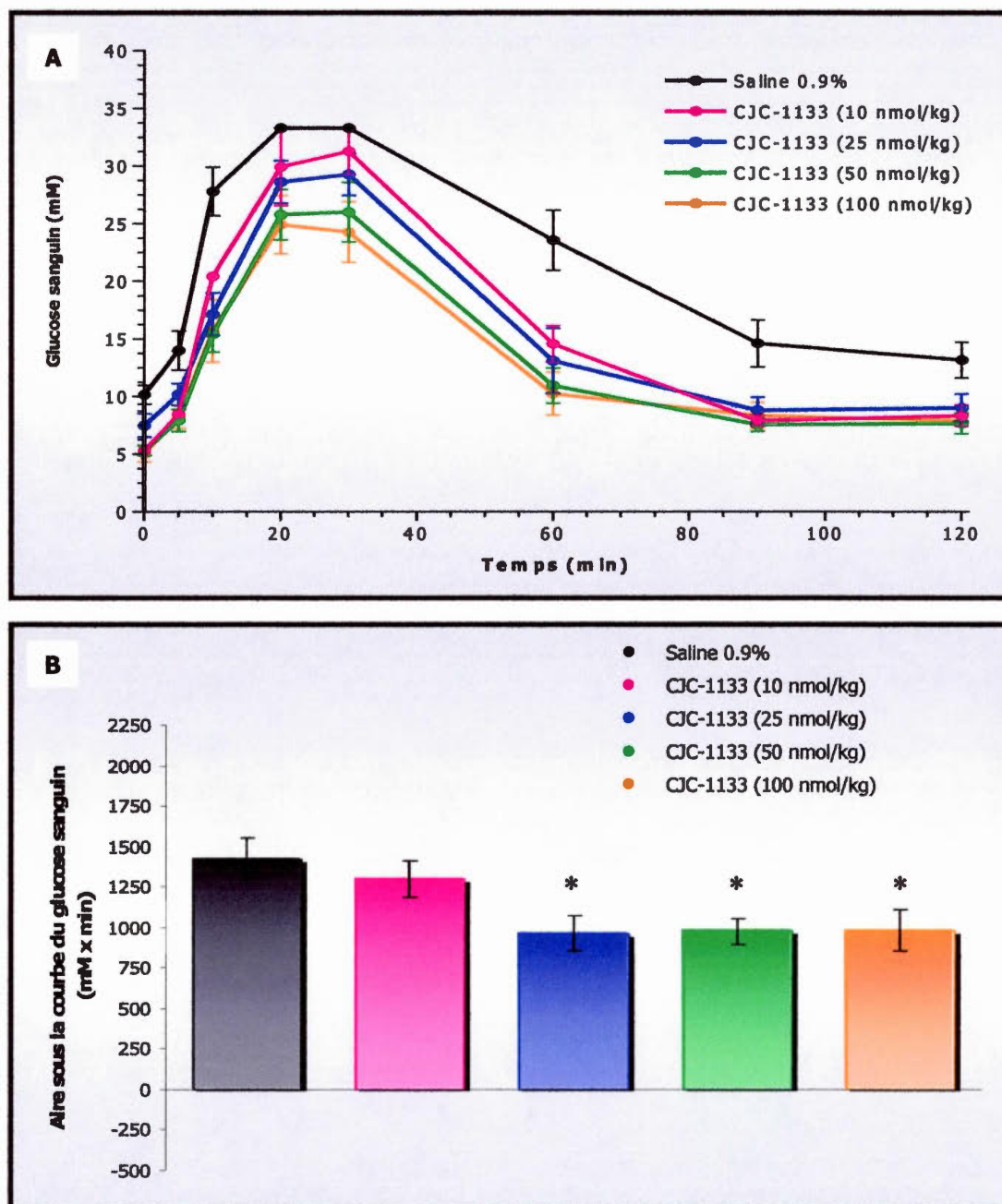


**Figure 3.14** Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) injectée avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1133). Des doses de 10, 25, 50 et 100 nmol/kg ont été injectées par voie sous-cutanée 5 minutes avant l'OGTT. (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin. \*\*  $P < 0.01$ .

avant l'OGTT, on peut observer un profil pharmacodynamique en fonction de la concentration beaucoup mieux défini, c'est-à-dire que l'effet est plus marqué avec une augmentation de la dose (figure 3.15). Il est à noter aussi la présence d'un plateau à 20 et 30 minutes pour le groupe contrôle, signifiant que la mesure du taux de glucose sanguin est excédée et que l'appareil ne peut lire au-delà d'une valeur de 33.3 mM. Dans le cas contraire, l'effet observé pour les groupes traités serait encore plus prononcé. On observe encore une diminution du taux de glucose jusqu'à un niveau plus bas que celui du groupe contrôle après une période de 120 minutes. Le profil pharmacodynamique en fonction de la concentration observé lorsque le DAC<sup>TM</sup> a été injecté 24 heures précédant l'OGTT démontre clairement que la plus faible dose administrée ne permet pas de prolonger l'activité insulínotropique jusqu'à 24 heures (figure 3.16). Par contre, pour les groupes ayant reçu 25, 50 et 100 nmol/kg, il est encore possible d'observer un effet significatif.

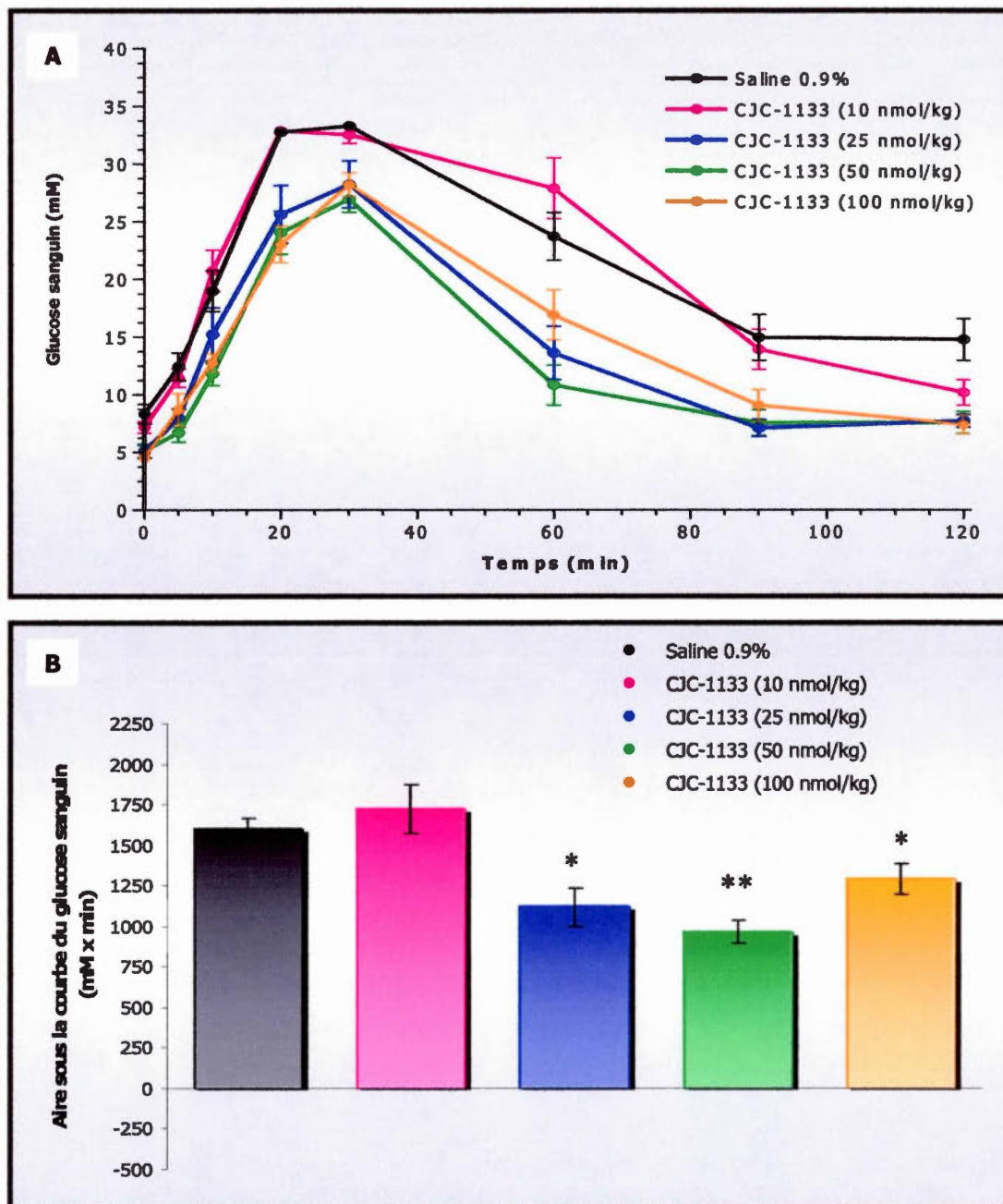
#### 3.4 Effet d'une seule injection d'exendin-4 et de ses dérivés (DAC<sup>TM</sup> et PC) sur la glycémie et la consommation d'eau et de nourriture des souris diabétiques

Dans le cadre de cette partie expérimentale, les souris diabétiques ont reçu une seule injection sous-cutanée d'exendin-4 et de ses dérivés (100 nmol/kg) ainsi que de la saline pour le groupe contrôle. La glycémie a été mesurée sur une période de 72 heures sans que les souris soient privées de nourriture, afin d'évaluer l'effet des composés sur un régime normal sans jeûne (figure 3.17). Suite à l'injection des composés, on peut observer clairement la diminution du taux de glucose sanguin chez les souris traitées avec l'exendin-4 libre (CJC-1132), le DAC<sup>TM</sup> (CJC-1134), le PC à l'albumine de rat (CJC-1730) et le PC à l'albumine humaine (CJC-1249). Les souris traitées avec le composé CJC-1733 (PC à l'albumine de rat avec le DAC<sup>TM</sup> en N-terminal) ne manifestent aucun effet insulínotropique et possèdent un profil très semblable à celui du groupe contrôle. On peut observer une diminution progressive du taux de glucose pendant les 8 premières heures suivant l'injection. Par la suite, la

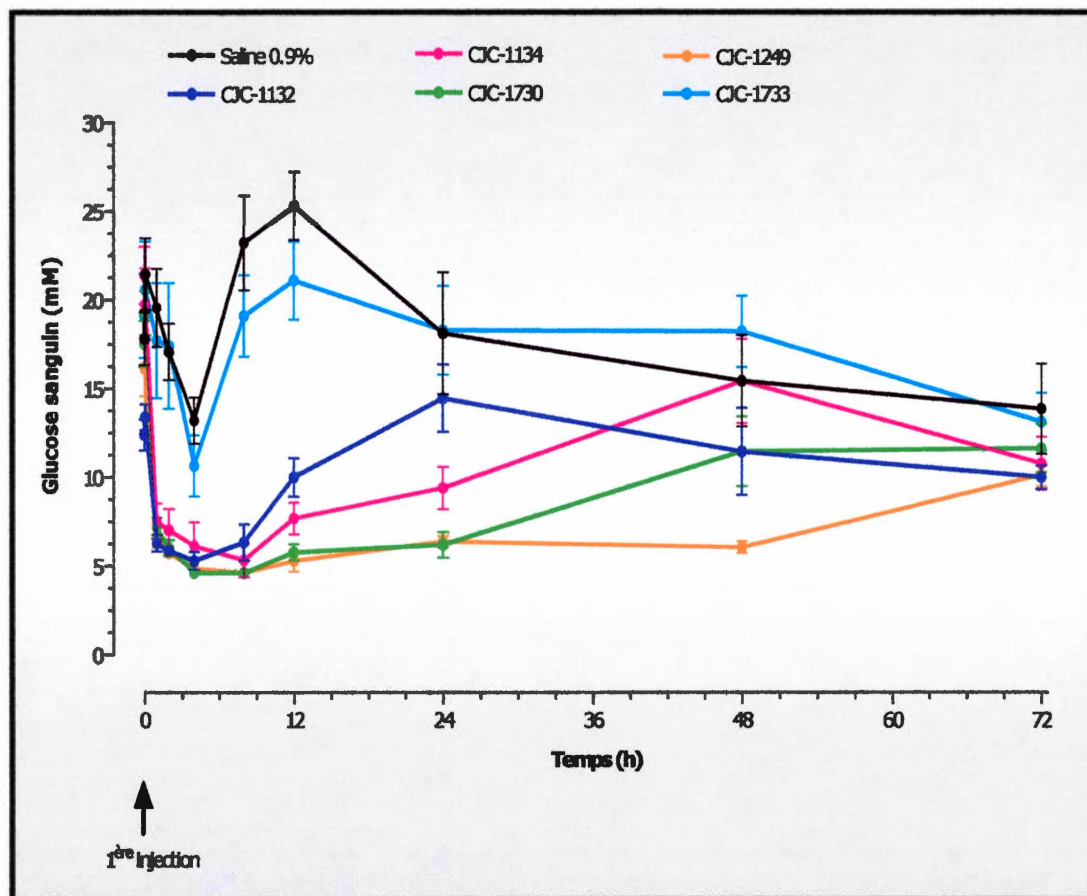


**Figure 3.15** Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) injectée avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1133). Des doses de 10, 25, 50 et 100 nmol/kg ont été injectées par voie sous-cutanée 12 heures avant l'OGTT. (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin. \*  $P < 0.05$ .





**Figure 3.16** Profil pharmacodynamique en fonction de la concentration chez la souris diabétique (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) injectée avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1133). Des doses de 10, 25, 50 et 100 nmol/kg ont été injectées par voie sous-cutanée 24 heures avant l'OGTT. (A) Courbe du glucose et (B) aire sous la courbe du glucose sanguin. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .



**Figure 3.17** Profil du taux de glucose sanguin chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) suivant une seule injection sous-cutanée de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134), CJC-1249 (PC HSA:1134) et CJC-1733 (PC RSA:1707). Le taux de glucose sanguin a été mesuré sur une période de 72 heures suivant l'injection et les souris n'ont pas subi de jeûne.

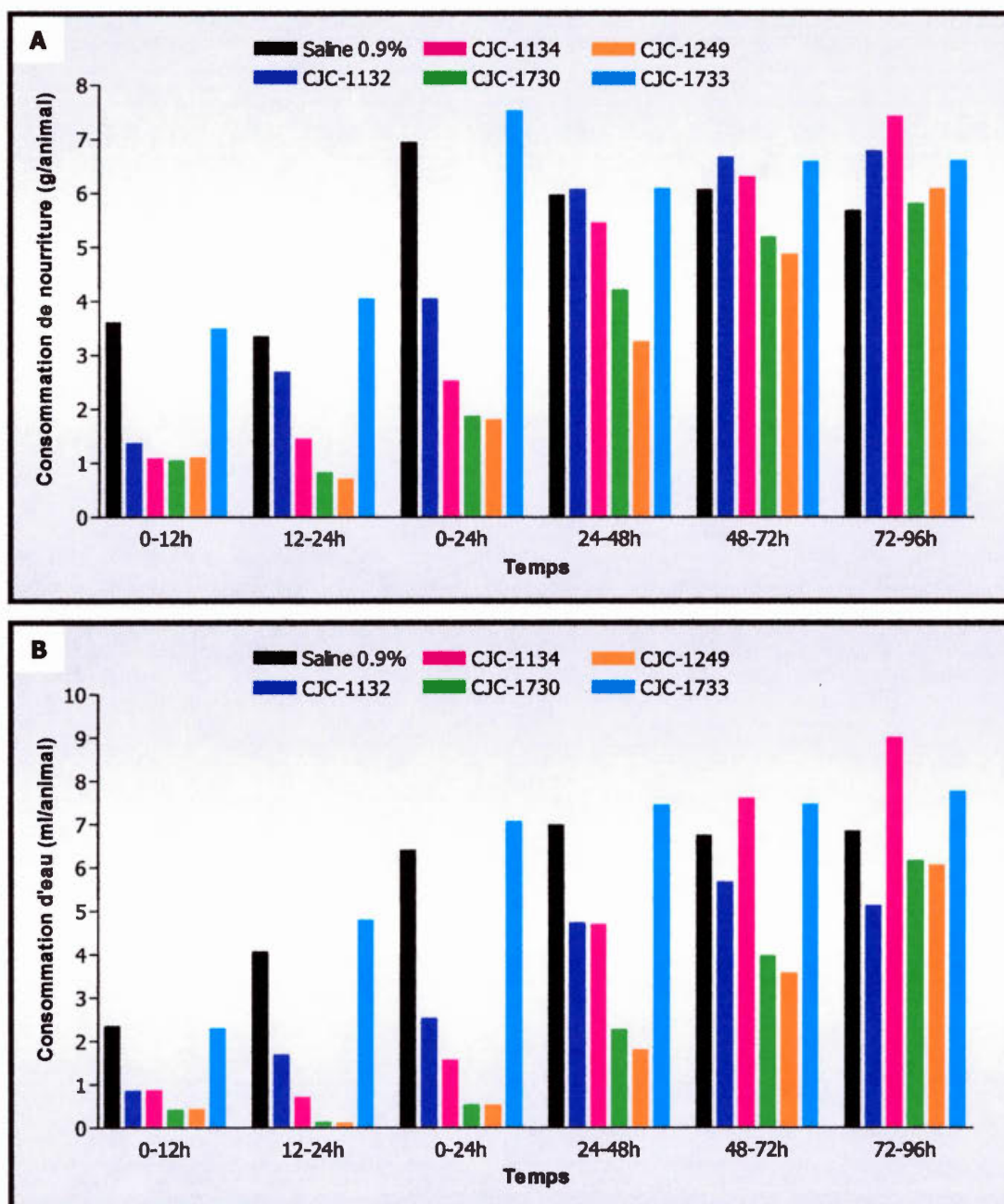
glycémie recommence à augmenter de façon plus prononcée pour l'exendin-4 libre, suivi du DAC™. Le conjugué pré-formé à l'albumine de rat (CJC-1730) et celui à l'albumine humaine (CJC-1249) permettent de maintenir un taux de glucose sanguin normal pour une période de 24 heures suivant l'injection. Même que l'injection de CJC-1249 permet de prolonger l'action insulinothèque au-delà de 48 heures et la glycémie remonte progressivement jusqu'à 72 heures, sans toutefois atteindre tout à fait le niveau du groupe contrôle. Le PC CJC-1730 commence à perdre de son potentiel après 24 heures et la glycémie recommence à augmenter progressivement. Donc, le potentiel insulinothèque diminue de façon logique selon la classe des composés, soit de l'exendin-4 libre en passant par le DAC™ et finalement du conjugué pré-formé à l'albumine de rat et celui à l'albumine humaine.

La consommation de nourriture et d'eau (figures 3.18a et b, respectivement) a été mesurée tout au long de cette partie expérimentale. Tous les composés injectés, à l'exception de la saline 0.9% et du CJC-1733, ont un effet marqué sur la consommation d'eau et de nourriture pendant une première période de 24 heures. L'effet est plus prononcé pour les composés CJC-1249 et CJC-1730. La consommation de nourriture pour les groupes injectés avec les composés CJC-1132 et CJC-1134 revient au niveau du groupe contrôle après 24 heures, tandis que les groupes injectés avec les composés CJC-1730 et CJC-1249 ont une consommation moindre jusqu'à 72 heures. La consommation d'eau est affectée de la même manière cependant, l'effet des composés CJC-1132 et CJC-1134 étant prolongé jusqu'à 48 heures.

### 3.5 Effet d'un protocole d'injections multiples d'exendin-4 et de ses dérivés (DAC™ et PC) sur la glycémie et la consommation d'eau et de nourriture des souris diabétiques

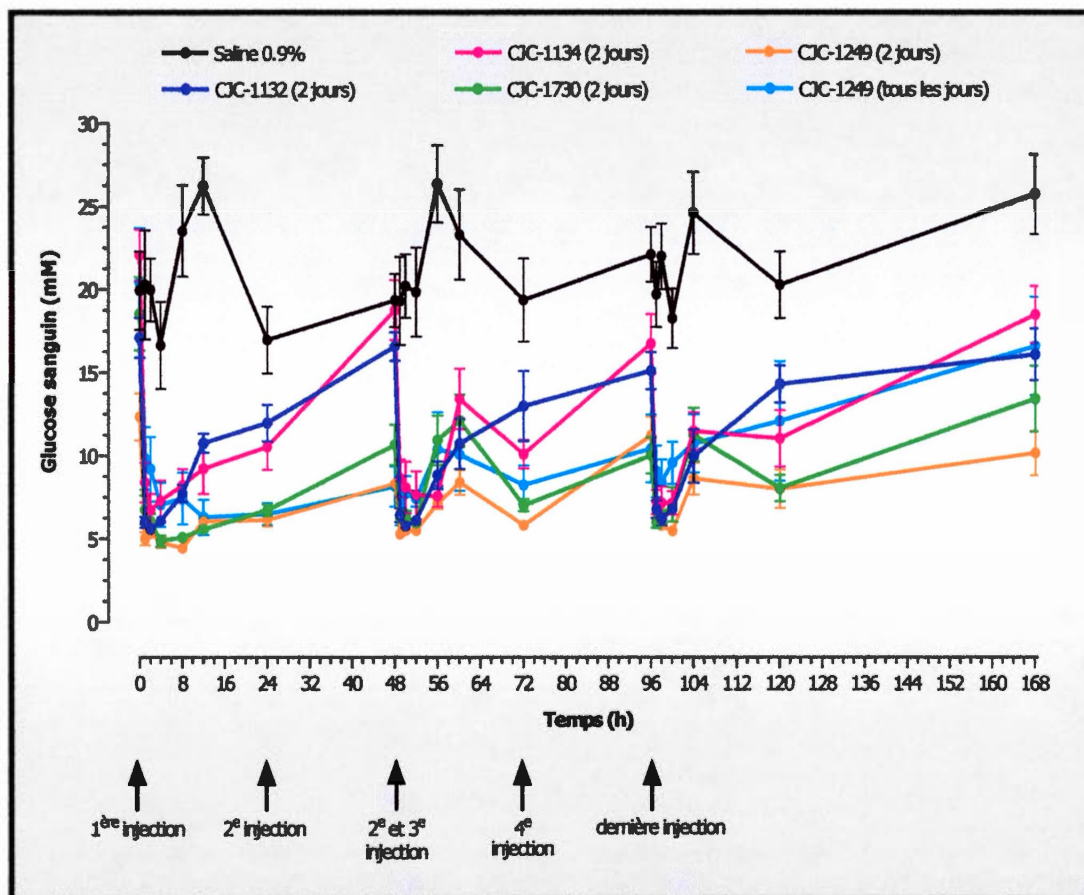
Les souris diabétiques ayant été traitées lors de la partie expérimentale précédente ont aussi été utilisées pour la présente étude, qui consiste à évaluer l'effet d'un régime d'injections multiples sur la glycémie des souris diabétiques. Les souris ont reçu une



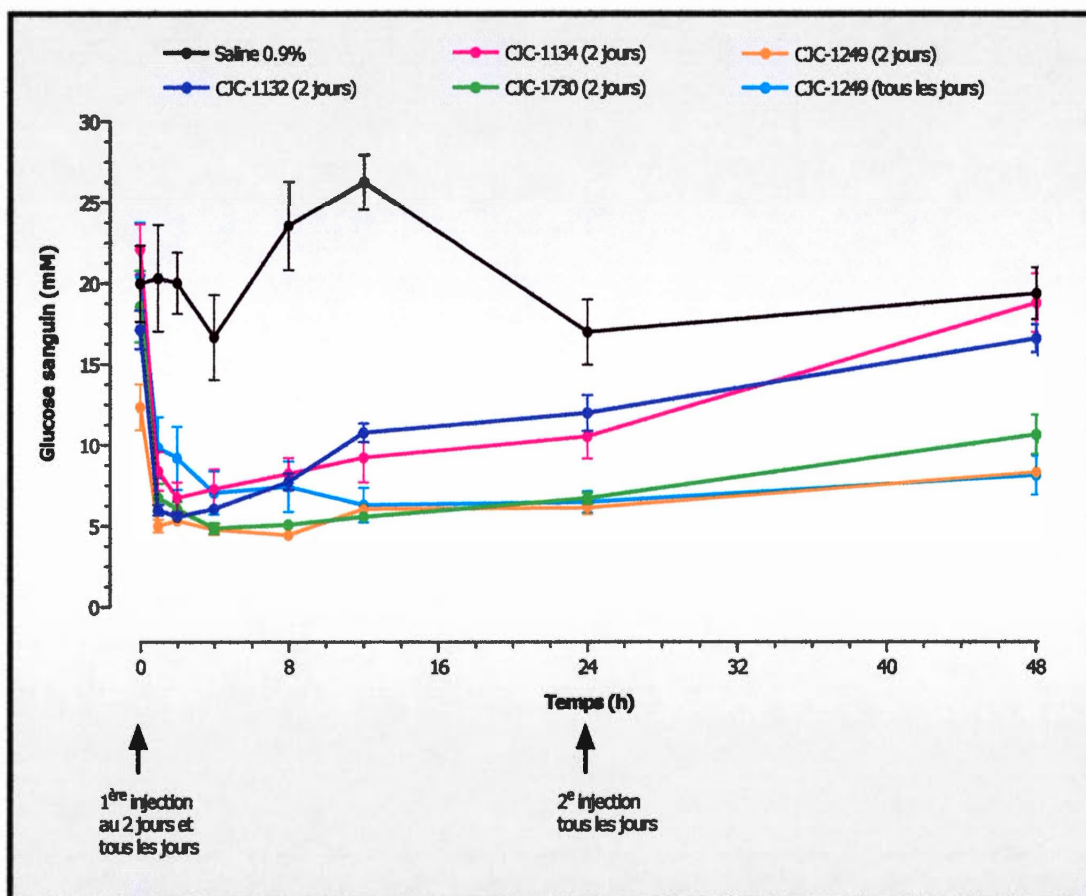


**Figure 3.18** Consommation de nourriture (A) et d'eau (B) chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) suivant une seule injection sous-cutanée de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134), CJC-1249 (PC HSA:1134) et CJC-1733 (PC RSA:1707). La consommation de nourriture et d'eau a été mesurée pendant une période de 96 heures suivant l'injection.

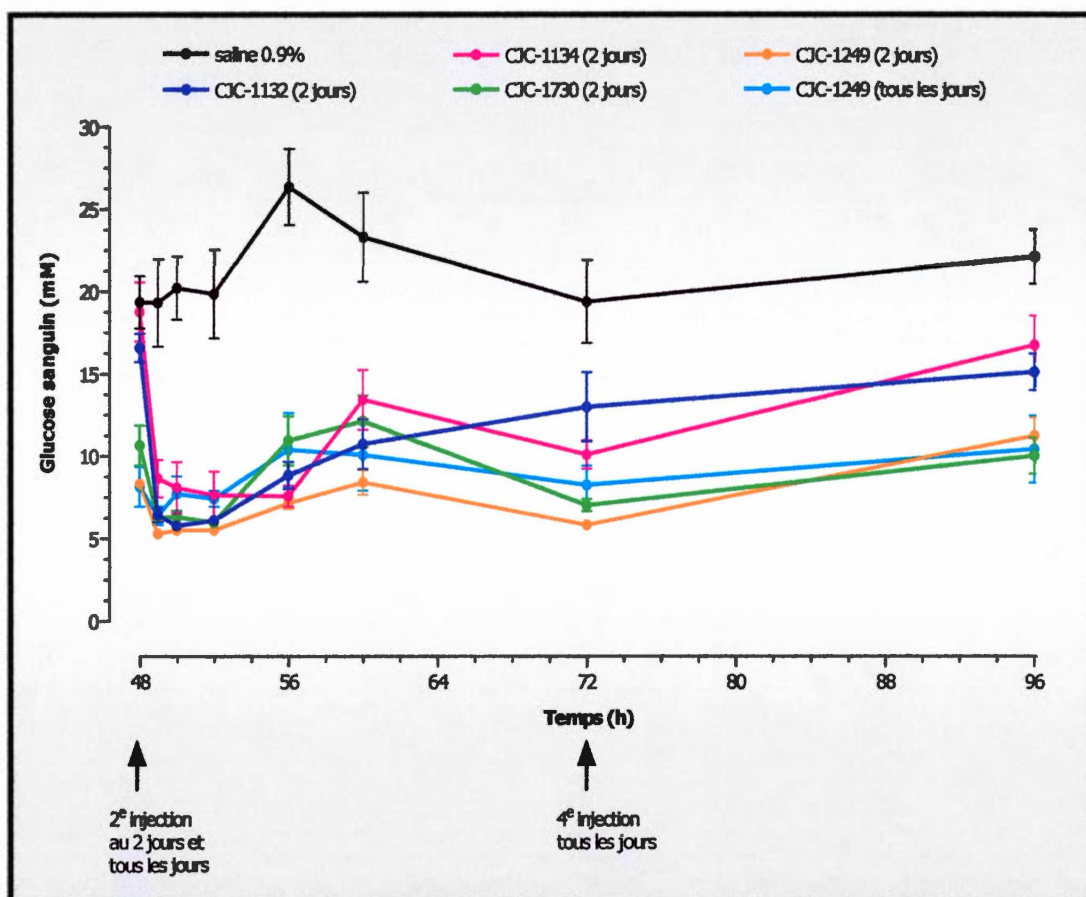
première injection sous-cutanée d'exendin-4 et de ses dérivés (100 nmol/kg), ainsi que de la saline pour le groupe contrôle. La glycémie a été mesurée sur une période de 24 heures (au temps 0, 60 min, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h et 24 h) sans que les souris ne soient privées de nourriture, afin d'évaluer l'effet des composés sur un régime normal sans jeûne (figure 3.19). Par la suite, les composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC à l'albumine de rat) et CJC-1249 (PC à l'albumine humaine) ont été injectés à 48 et 96 heures suivant la première injection. Un autre groupe de souris a été injecté à 24, 48, 72 et 96 heures avec le composé CJC-1249. La glycémie a été mesurée aux temps suivants suite à la première injection, soit 48 h (2 jours), 49 h, 50 h, 52 h, 56 h, 60 h, 72 h (3 jours), 96 h (4 jours), 97 h, 98 h, 100 h, 104 h, 120 h (5 jours) et, finalement, à 168 heures (7 jours). On observe la rapide diminution du taux de glucose sanguin suite à la première injection des composés. Il est à noter que la glycémie basale du groupe traité avec le composé CJC-1249 aux 2 jours est plus basse, compte tenu du fait que ces souris ont été traitées avec ce même composé au cours de l'étude précédente. On peut observer une diminution progressive du taux de glucose pendant les 8 premières heures suivant l'injection. Par la suite, la glycémie recommence à augmenter de façon plus prononcée pour l'exendin-4 libre, suivi du DAC<sup>TM</sup>. Le conjugué pré-formé à l'albumine de rat (CJC-1730) et celui à l'albumine humaine (CJC-1249) permettent de maintenir un taux de glucose sanguin normal pendant une période de 48 heures suivant l'injection (figure 3.20). Malgré une seconde injection du composé CJC-1249 à 24 heures, le taux de glucose sanguin reste pratiquement le même que celui du groupe injecté aux 2 jours. On obtient presque le même profil lorsque les composés sont injectés à 48 heures, mais l'effet est plus soutenu pour les composés CJC-1132 et CJC-1134, dont la glycémie n'atteint pas celle du groupe contrôle après 96 heures (figure 3.21). Par contre, suite à la dernière injection des composés à 96 heures, on remarque une perte de l'effet du composé CJC-1249 injecté à tous les jours sur le maintien de la glycémie, dont le profil correspond pratiquement à celui des



**Figure 3.19** Profil du taux de glucose sanguin chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M<sup>+/+</sup>Lepr<sup>db</sup>) suivant un protocole d'injections multiples sous-cutanées de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134) et CJC-1249 (PC HSA:1134). Les souris ont été injectées aux 2 jours (0, 48 et 96 heures) pour tous les composés et à tous les jours (0, 24, 48, 72 et 96 heures) pour le composé CJC-1249. Le taux de glucose sanguin a été mesuré sur une période de 7 jours (168 heures) suivant l'injection et les souris n'ont pas subi de jeûne.



**Figure 3.20** Profil du taux de glucose sanguin de 0 à 48 heures chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) suivant un protocole d'injections multiples sous-cutanées de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134) et CJC-1249 (PC HSA:1134).



**Figure 3.21** Profil du taux de glucose sanguin de 48 à 96 heures chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) suivant un protocole d'injections multiples sous-cutanées de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134) et CJC-1249 (PC HSA:1134).

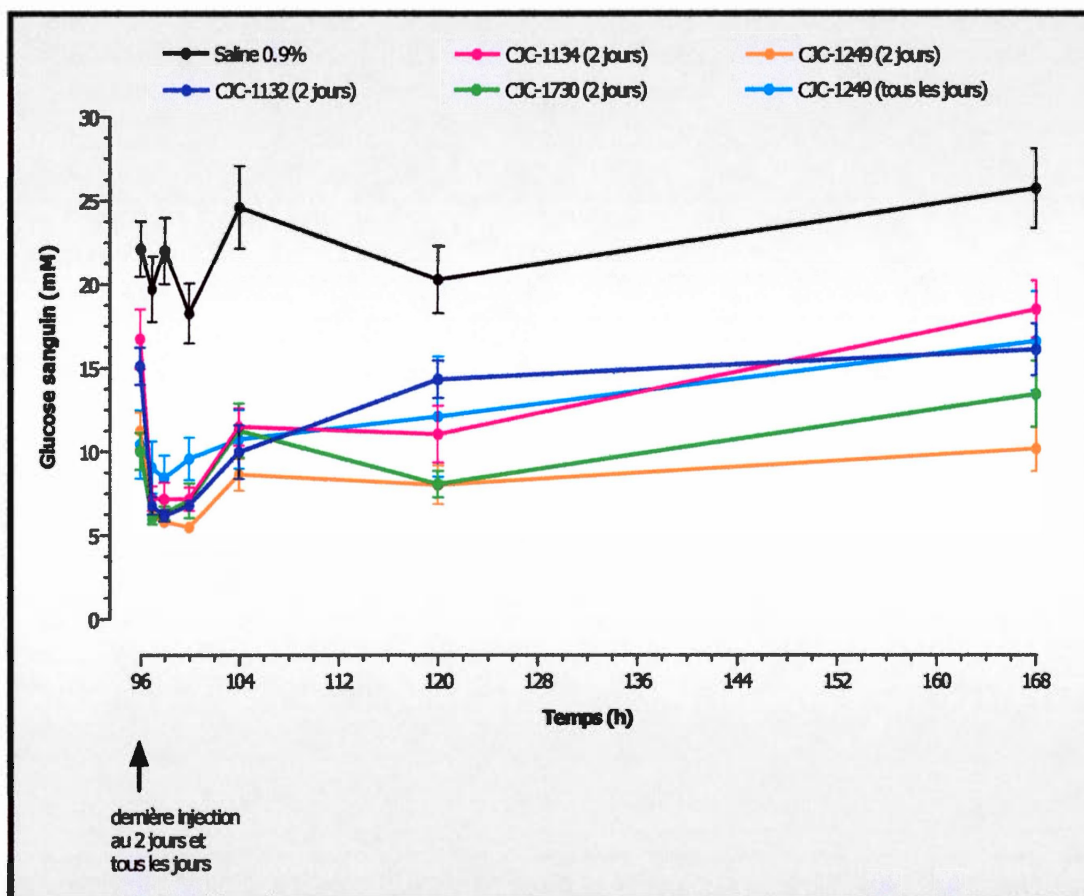


groupes traités avec le CJC-1132 et CJC-1134. La glycémie des groupes traités avec les composés CJC-1730 (PC à l'albumine de rat) et CJC-1249 (PC à l'albumine humaine) est encore très bien contrôlée après 5 et 7 jours. Par contre, la glycémie de tous les autres groupes traités n'atteint pas celle du groupe contrôle, même après 7 jours (figure 3.22).

La consommation de nourriture et d'eau (figures 3.23a et b, respectivement) a aussi été mesurée tout au long de cette partie expérimentale. Tous les composés injectés, à l'exception de la saline 0.9%, ont un effet marqué sur la consommation d'eau et de nourriture sur une première période de 24 heures. L'effet est plus prononcé pour les composés CJC-1249 et CJC-1730. La consommation de nourriture pour les groupes injectés avec les composés CJC-1132 et CJC-1134 revient au niveau du groupe contrôle après 24 heures, mais diminue à chaque injection des composés, soit à 48 et 96 heures. Les groupes injectés avec les composés CJC-1730 et CJC-1249 ont une consommation moindre, soutenue jusqu'à 120 heures. Ensuite, tous les groupes reviennent à une consommation semblable à celle du groupe contrôle. La consommation d'eau est affectée de la même manière; cependant, l'effet des composés est plus soutenu, puisque la consommation n'atteint pas celle du groupe contrôle, même après 168 heures.

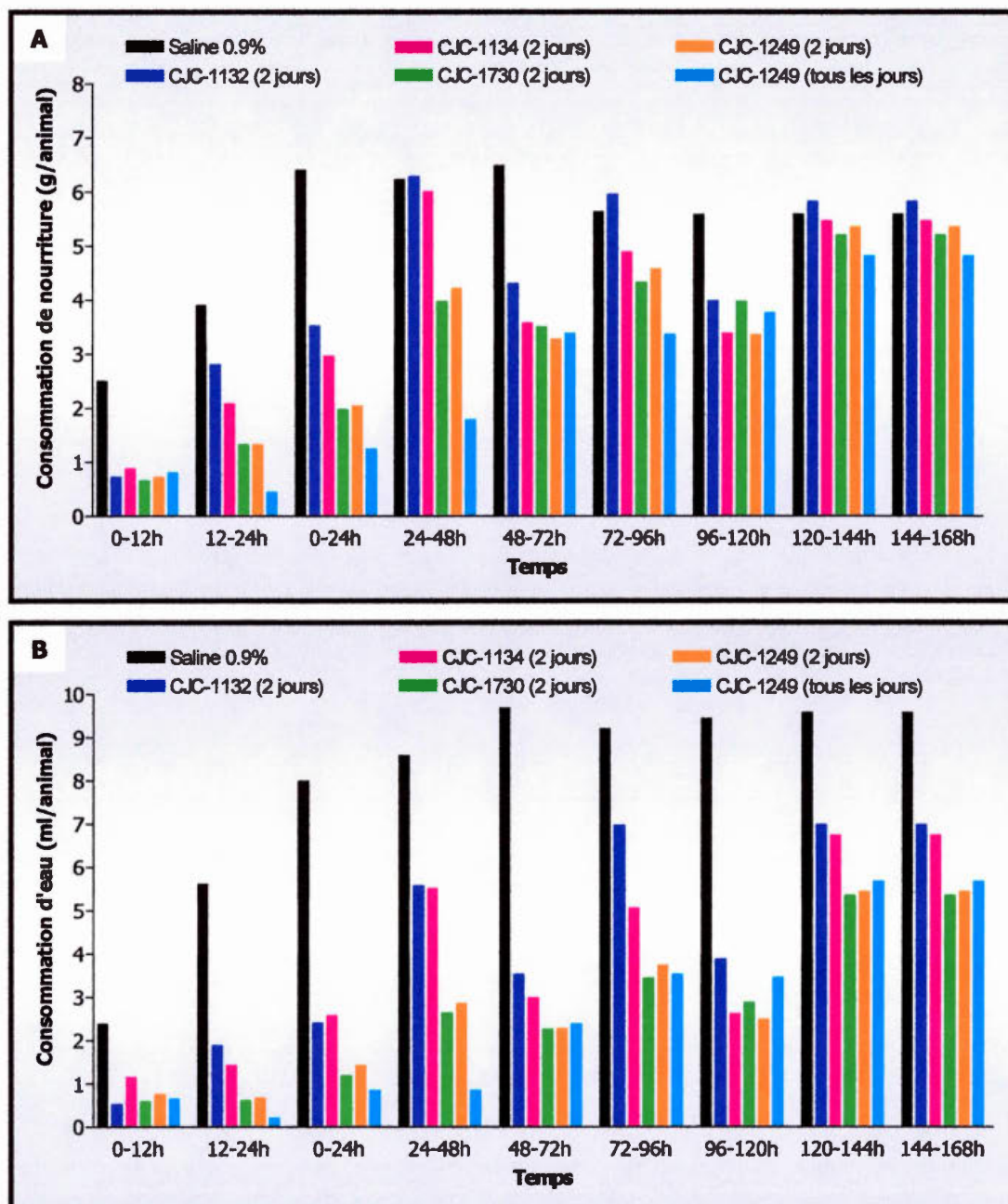
### 3.6 Effet global de l'exendin-4 et de ses dérivés (DAC<sup>TM</sup> et PC) sur la prise de poids et la concentration d'insuline plasmatique des souris diabétiques

Le poids des souris diabétiques a été mesuré tout au long de l'étude combinée d'une seule injection et du protocole d'injections multiples de l'exendin-4 et de ses dérivés. Les souris ont été pesées 2 jours avant de début de la première partie expérimentale; elles ont ensuite été pesées aux jours 1, 5, 8, 10, 12 et 15 suivant la première injection (figure 3.24). Malgré la grande variabilité du poids corporel des souris, il est possible d'observer une tendance pour les groupe traités avec les composés CJC-1730 et CJC-1249 aux 2 jours. La prise de poids est moindre que

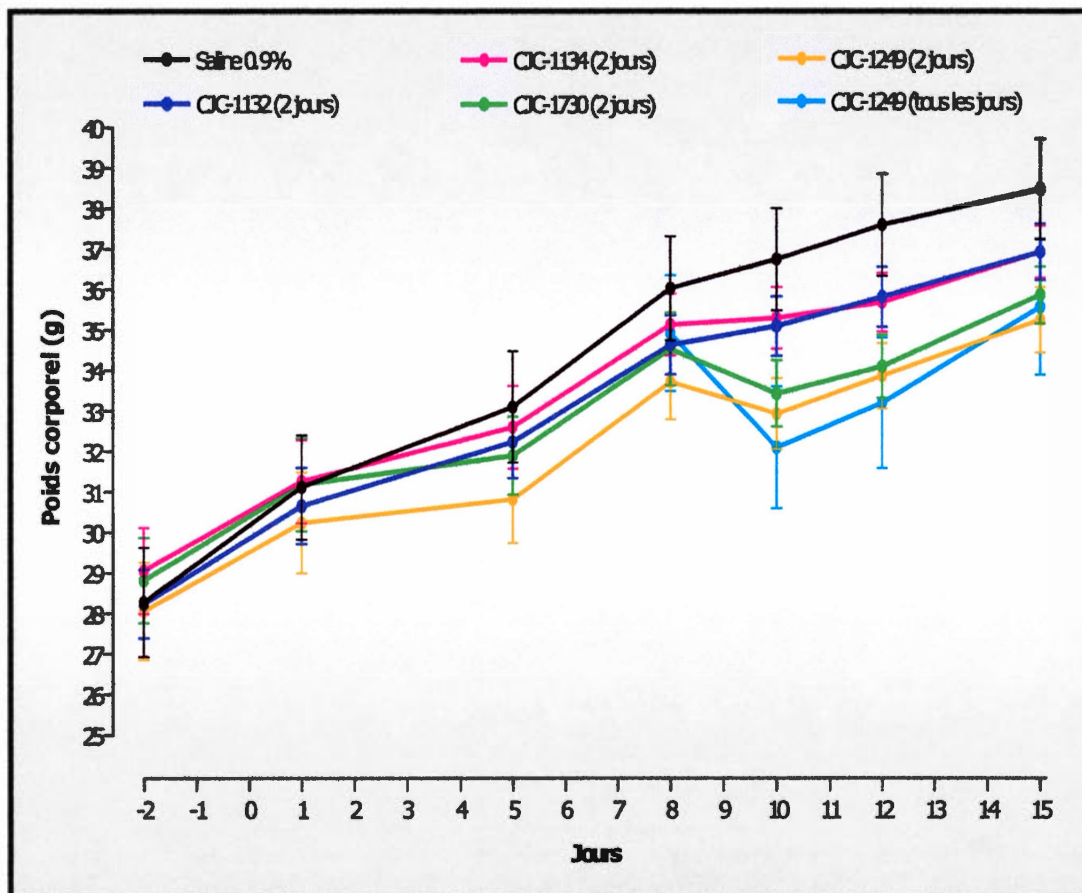


**Figure 3.22** Profil du taux de glucose sanguin de 96 à 168 heures chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) suivant un protocole d'injections multiples sous-cutanées de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134) et CJC-1249 (PC HSA:1134).





**Figure 3.23** Consommation (A) de nourriture et (B) d'eau chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) suivant un protocole d'injections multiples sous-cutanées de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134) et CJC-1249 (PC HSA:1134). La consommation de nourriture et d'eau a été mesurée sur une période de 7 jours (168 heures) suivant l'injection.



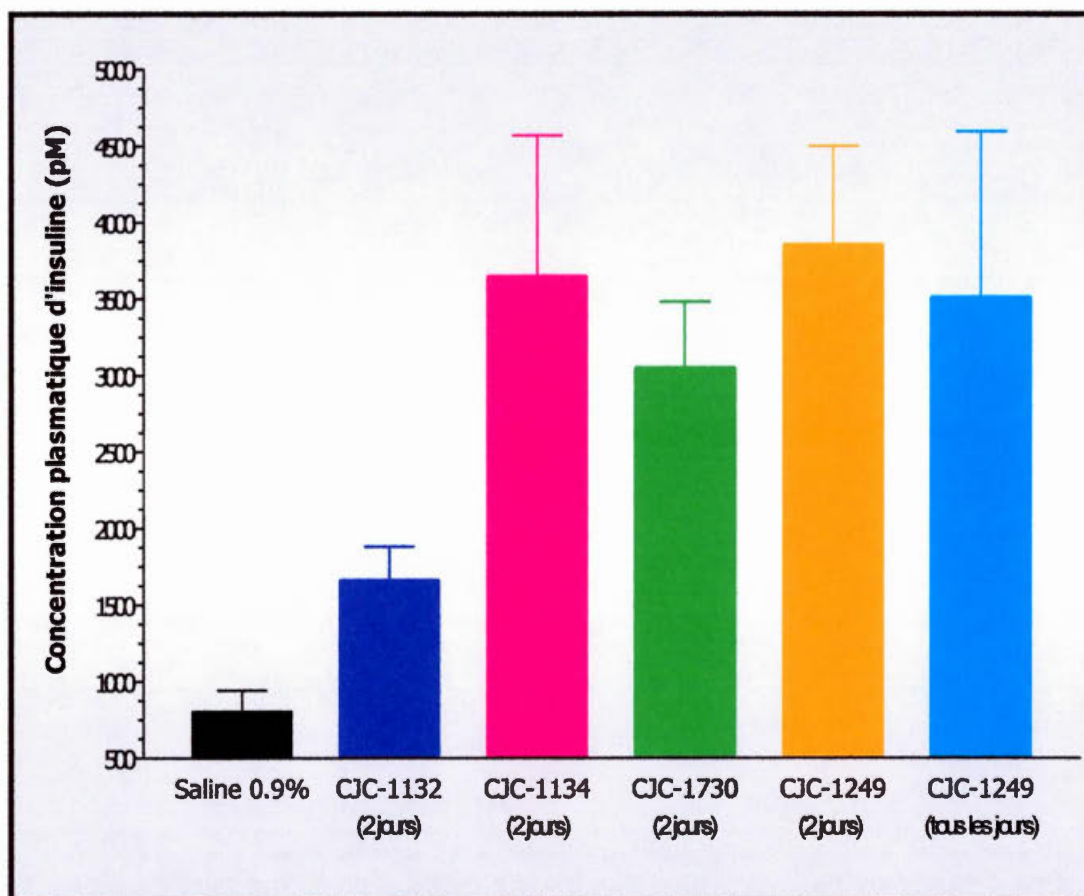
**Figure 3.24** Profil de la prise de poids des souris diabétiques (C57BLKS/J-M<sup>+/+</sup>Lepr<sup>db</sup>) pendant la durée entière de l'expérimentation avec une seule injection et le protocole d'injections multiples sous-cutanée de 100 nmol/kg des composés CJC-1132 (exendin-4 libre), CJC-1134 (DAC exendin-4), CJC-1730 (PC RSA:1134), CJC-1249 (PC HSA:1134) et CJC-1733 (PC RSA:1707).

celle du groupe contrôle, soit 24% pour CJC-1730 et 26% pour CJC-1249. Même pour les groupes traités avec les composés CJC-1132 et CJC-1134, il y a un effet sur la prise de poids en comparaison avec le groupe contrôle (31% et 27% respectivement). Le poids des souris traitées avec le composé CJC-1249 tous les jours a été pris à partir du jour 8, correspondant au premier jour suivant le début de la seconde partie expérimentale. L'augmentation du poids corporel est seulement de 2%, en comparaison avec le groupe contrôle dont la prise de poids est de 6.8% pour cette même période. Pour les composés CJC-1132, CJC-1134, CJC-1730 et CJC-1249, l'augmentation est de 6.6%, 5.1%, 3.8% et 4.5%, respectivement.

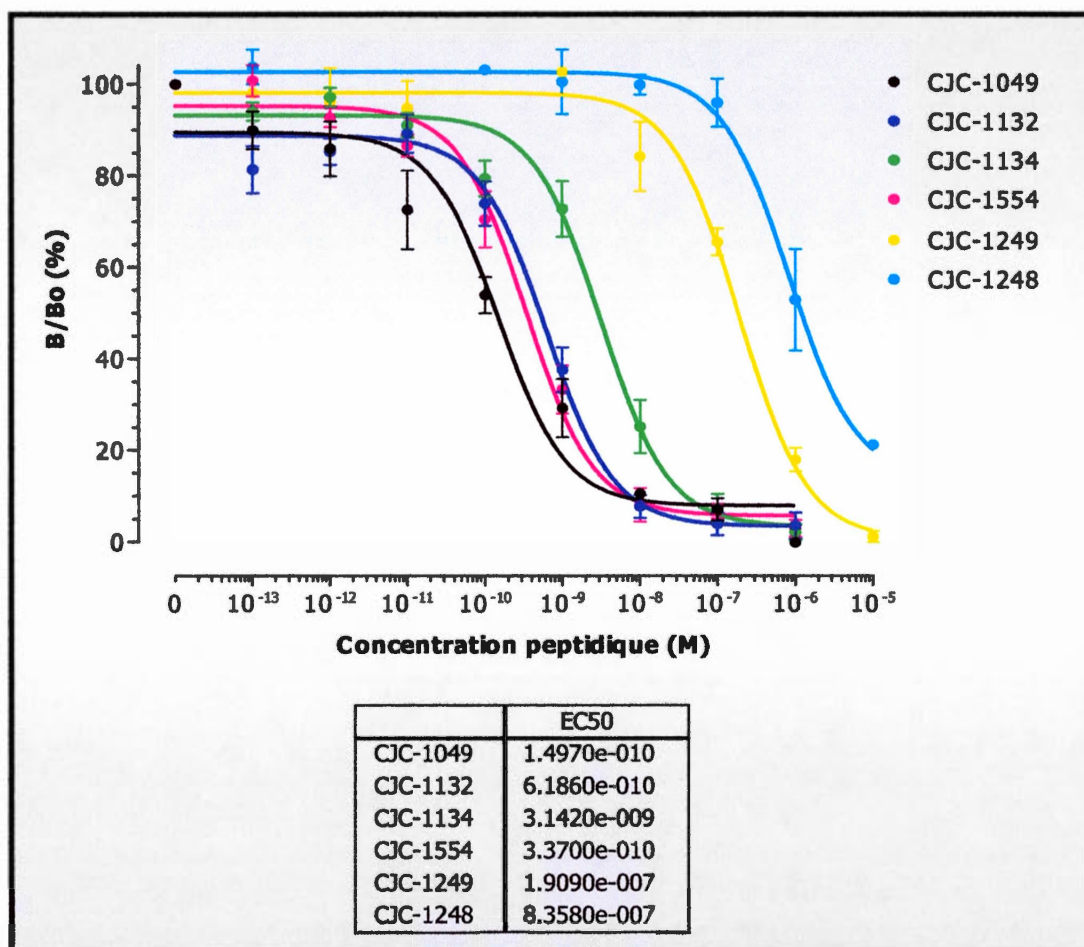
Une fois la dernière partie expérimentale terminée, un échantillon sanguin a été prélevé de chacune des souris afin d'analyser la concentration plasmatique en insuline suite à l'injection de l'exendin-4 et de ses dérivés (figure 3.25). On observe très bien l'augmentation du niveau d'insuline en circulation pour tous les groupes traités, en comparaison avec le groupe contrôle. Le groupe traité avec l'exendin-4 libre (CJC-1132) montre un niveau d'insuline moins élevé que les autres groupes, dont la concentration d'insuline est très semblable.

### 3.7 Détermination du potentiel de liaison au récepteur du GLP-1, de l'exendin-4 et de ses dérivés

Des cellules CHO ont été transfectées afin d'exprimer à leur surface le récepteur humain du GLP-1. Une étude de liaison a donc été réalisée afin d'évaluer le potentiel agoniste de l'exendin-4 et de ses dérivés à se lier aux récepteurs en comparaison au GLP-1 natif (figure 3.26). Les valeurs de  $EC_{50}$ , qui représentent la concentration molaire de l'agoniste produisant 50% de la réponse maximale possible par rapport au contrôle, ont été calculées. L'exendin-4 libre (CJC-1132) et le composé CJC-1554 (DAC<sup>TM</sup> exendin-4 *quenched*) manifestent une forte affinité pour le récepteur, avec des valeurs de  $EC_{50}$  de 0.62 nM et 0.34 nM respectivement, en comparaison avec l' $EC_{50}$  du GLP-1 qui est de 0.15 nM. Le composé CJC-1134 (DAC<sup>TM</sup> exendin-4) possède une affinité inférieure d'environ 10X comparativement aux deux autres



**Figure 3.25** Détermination de la concentration plasmatique d'insuline des échantillons sanguins prélevés chez les souris diabétiques (C57BLKS/J-M+/+Lepr<sup>db</sup>) à la fin de la partie expérimentale du protocole d'injections multiples. La détermination du taux d'insuline plasmatique a été réalisée au moyen d'un essai EIA commercial.



**Figure 3.26** Détermination du potentiel de liaison au récepteur des cellules CHO du GLP-1 natif (CJC-1049), de l'exendin-4 libre (CJC-1132), du DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1134), du DAC<sup>TM</sup> exendin-4 *quenched* (CJC-1554), du conjugué exendin-4 à l'albumine humaine (CJC-1249) et du conjugué GLP-1 (dAla<sup>8</sup>) à l'albumine humaine (CJC-1248). (n=3)



composés, soit 3.1 nM. Pour ce qui est des conjugués pré-formés CJC-1249 (PC à l'albumine humaine exendin-4) et CJC-1248 (PC à l'albumine humaine GLP-1), il y a une forte diminution de l'affinité au récepteur avec des valeurs de  $EC_{50}$  de 190 nM et 840 nM, respectivement.

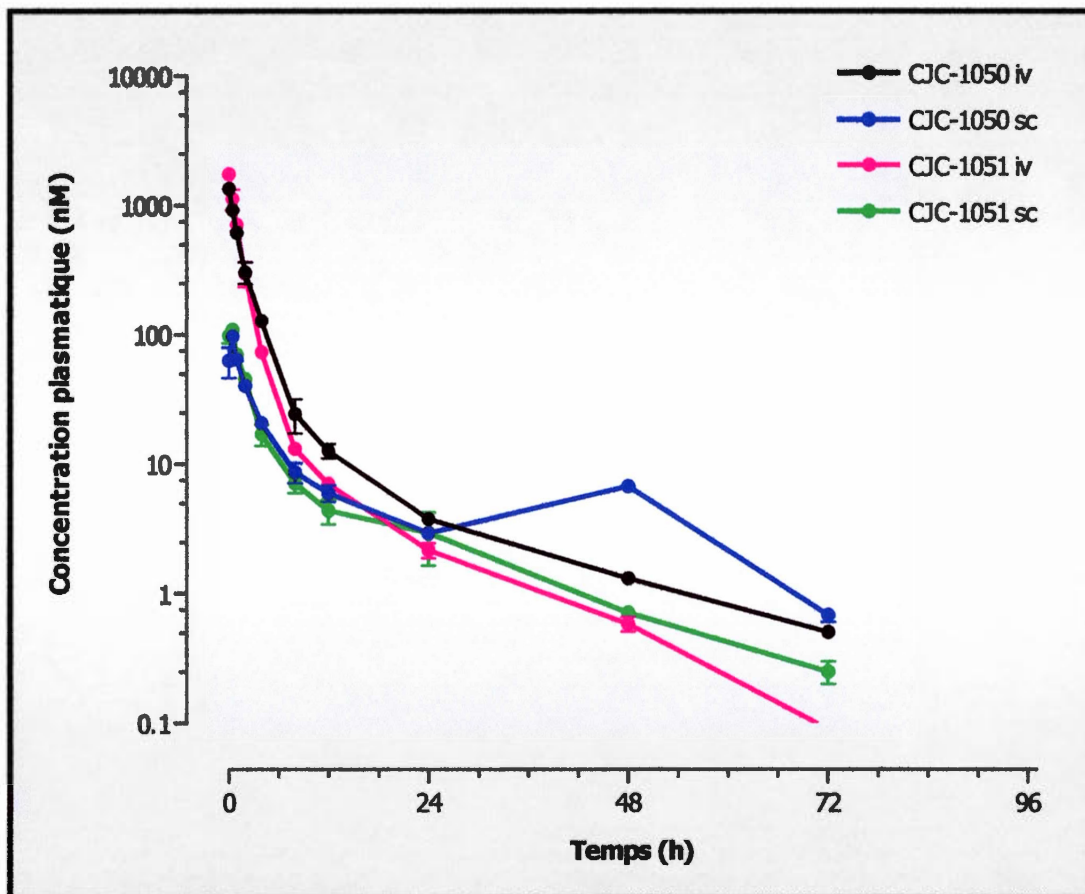
### 3.8 Étude de pharmacocinétique

Dans le cadre de cette partie expérimentale, le modèle animal utilisé a été le rat mâle Sprague Dawley. Les souris diabétiques n'ont pas été choisies pour cette partie expérimentale dû aux contraintes entraînées par les manipulations dans le cadre des études de pharmacocinétiques. Un trop grand nombre d'animaux aurait été requis et le volume sanguin pouvant être prélevé sur une souris n'est pas suffisant pour les analyses ultérieures. Tous les composés de cette étude ont été administrés par voie intraveineuse et sous-cutanée, à des doses de 100 nmol/kg et 500 nmol/kg, respectivement. Le profil pharmacocinétique a été obtenu suite à l'analyse des échantillons sanguins par RIA.

#### 3.8.1 Profil pharmacocinétique des DAC™ GLP-1

Le profil obtenu suite à l'injection des DAC™ GLP-1, CJC-1050 et CJC-1051 par voie intraveineuse et par voie sous-cutanée a permis de déterminer plusieurs paramètres pharmacocinétiques (figure 3.27). Le temps de demi-vie du composé CJC-1050 est de 16 heures en administration intraveineuse et de 15 heures en administration sous-cutanée. Pour ce qui est du CJC-1051, le temps de demi-vie est de 10 heures et 14 heures suite à l'administration intraveineuse et sous-cutanée, respectivement. La biodisponibilité des composés administrés par voie intraveineuse est toujours de 100%; par contre, on obtient seulement une biodisponibilité de 4% quand les composés sont injectés en mode sous-cutané. Il est à noter que la dose injectée de manière sous-cutanée est 5 fois plus élevée que la dose intraveineuse. On peut aussi observer que la concentration plasmatique maximale est beaucoup plus





**Figure 3.27** Profil pharmacocinétique des composés CJC-1050 et CJC-1051 injectés par voie intraveineuse et sous-cutanée chez le rat Sprague Dawley. Les doses injectées sont de 100 nmol/kg iv et 500 nmol/kg sc.

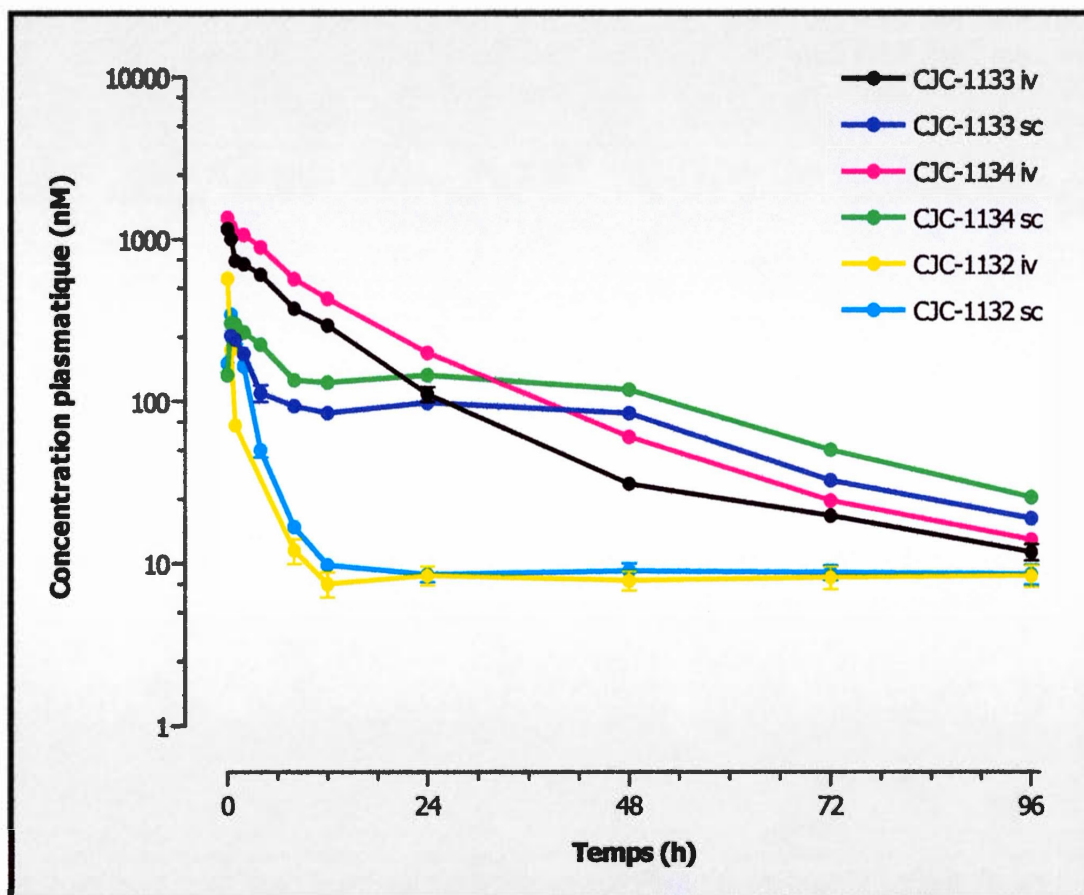
élevée par voie intraveineuse. Les deux composés possèdent un profil pharmacocinétique très semblable et restent en circulation jusqu'à 72 heures suivant l'administration. Le profil du GLP-1 natif n'apparaît pas sur cette figure, puisque son élimination rapide ne permet pas sa détection par la méthode RIA utilisée.

### 3.8.2 Profil pharmacocinétique de l'exendin-4 et des DAC<sup>TM</sup> exendin-4

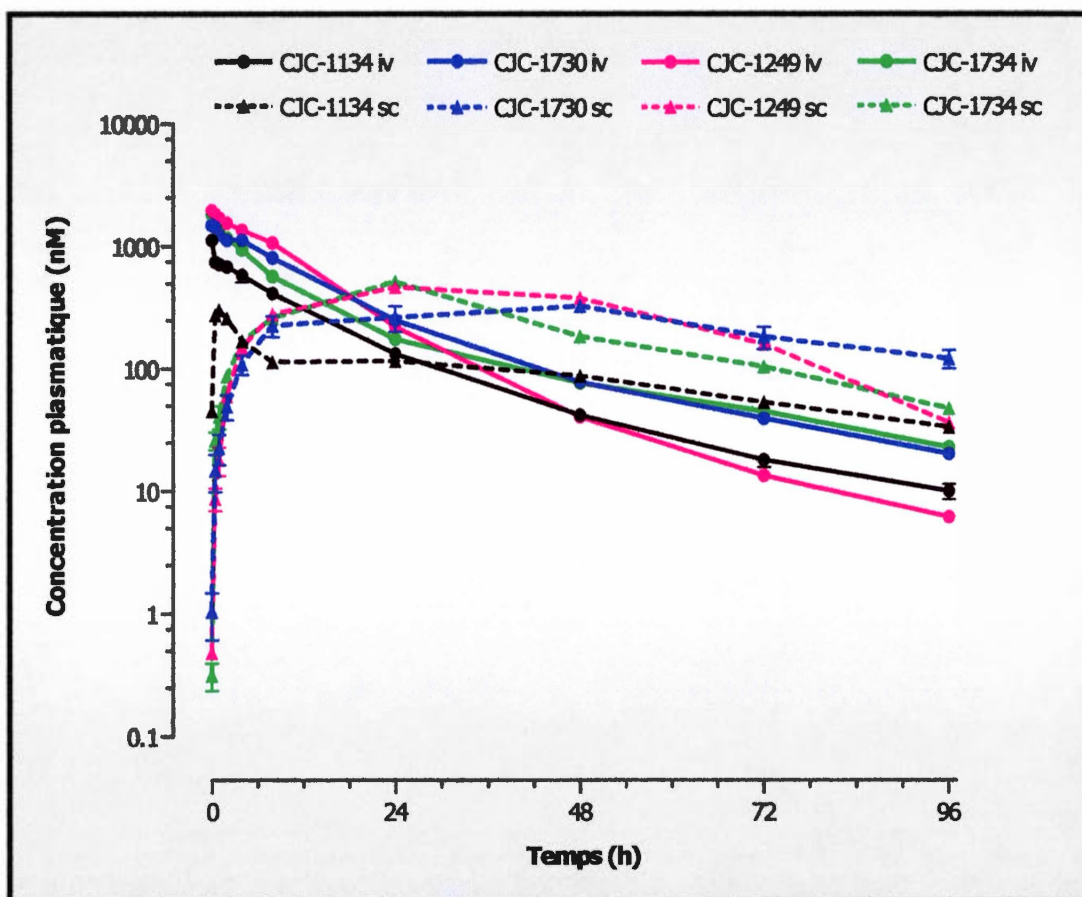
L'exendin-4 libre (CJC-1132) et les deux DAC (CJC-1133 et CJC-1134) ont été aussi injectés chez le rat Sprague Dawley selon le même protocole et à des doses identiques (figure 3.28). Le profil pharmacocinétique obtenu démontre déjà que l'exendin-4 libre demeure en circulation beaucoup plus longtemps que le GLP-1, avec un temps de demi-vie de 30 et 90 minutes par voie intraveineuse et sous-cutanée, respectivement. Les deux DAC<sup>TM</sup> CJC-1133 et CJC-1134 possèdent un profil très semblable, avec des temps de demi-vie d'environ 22 heures et variant très peu entre les voies intraveineuse et sous-cutanée. Par contre, la biodisponibilité est beaucoup plus grande pour les DAC<sup>TM</sup> exendin-4 que pour les DAC<sup>TM</sup> GLP-1, soit 13% versus 4%. La biodisponibilité du composé libre est tout de même supérieure, soit 22%, lorsqu'administré par voie sous-cutanée. On peut aussi observer que les DAC<sup>TM</sup> exendin-4 sont présents en circulation, jusqu'à 96 heures suivant l'administration.

### 3.8.3 Profil pharmacocinétique des dérivés de l'exendin-4 (DAC<sup>TM</sup> et PC)

La dernière étape de cette partie expérimentale a consisté à évaluer aussi le profil pharmacocinétique des conjugués pré-formés (CJC-1730, CJC-1734 et CJC-1249), ainsi que d'un DAC<sup>TM</sup>, le CJC-1134 (figure 3.29). Suite à l'analyse de tous les profils, ce sont les composés CJC-1730 et CJC-1134 qui possèdent les temps de demi-vie les plus élevés, soit 23 et 25 heures par voie intraveineuse, et 33 et 35 heures par voie sous-cutanée. Le composé CJC-1734 possède un temps de demi-vie de 26 heures par voie iv et de 23 heures par voie sc. Le composé disparaissant le plus



**Figure 3.28** Profil pharmacocinétique des composés CJC-1132, CJC-1133 et CJC-1134 injectés par voie intraveineuse et sous-cutanée chez le rat Sprague Dawley. Les doses injectées sont de 100 nmol/kg iv et 500 nmol/kg sc.

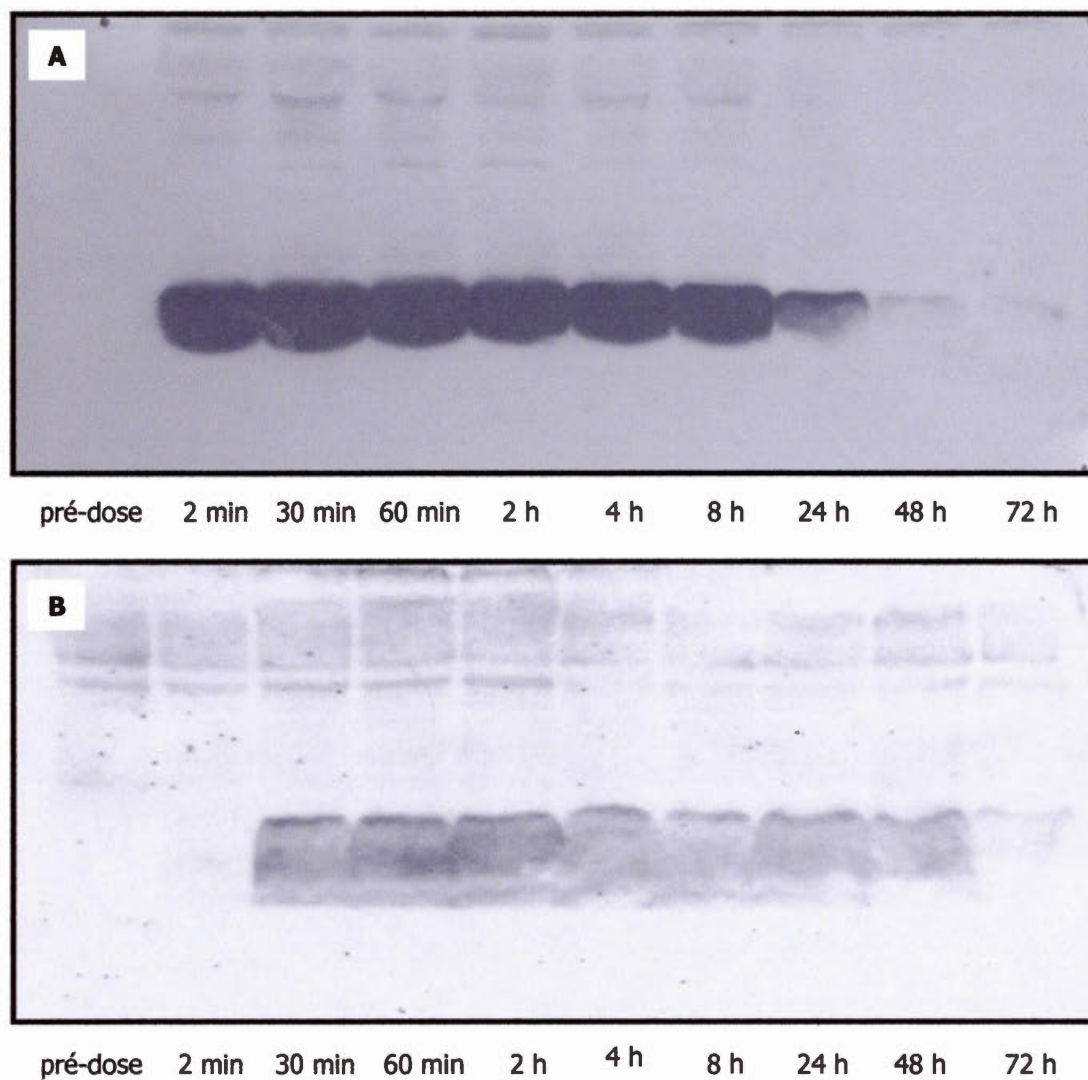


**Figure 3.29** Profil pharmacocinétique des composés CJC-1134, CJC-1730, CJC1249 et CJC-1734 injectés par voie intraveineuse et sous-cutanée chez le rat Sprague Dawley. Les doses injectées sont de 100 nmol/kg iv et 500 nmol/kg sc.

rapidement de la circulation est le CJC-1249, avec des temps de demi-vie de 13 et 14 heures par voie iv et sc, respectivement. Par contre, la biodisponibilité des PC-DAC<sup>TM</sup> (CJC-1730, CJC-1249 et CJC-1734) est en moyenne de 22 %, comparativement à celle du DAC<sup>TM</sup> CJC-1134, qui est de 16%. Tous ces dérivés de l'exendin-4 sont présents en circulation au-delà de 96 heures suivant l'injection; aussi, l'administration par voie sous-cutanée permet une élimination encore moins rapide que par voie intraveineuse.

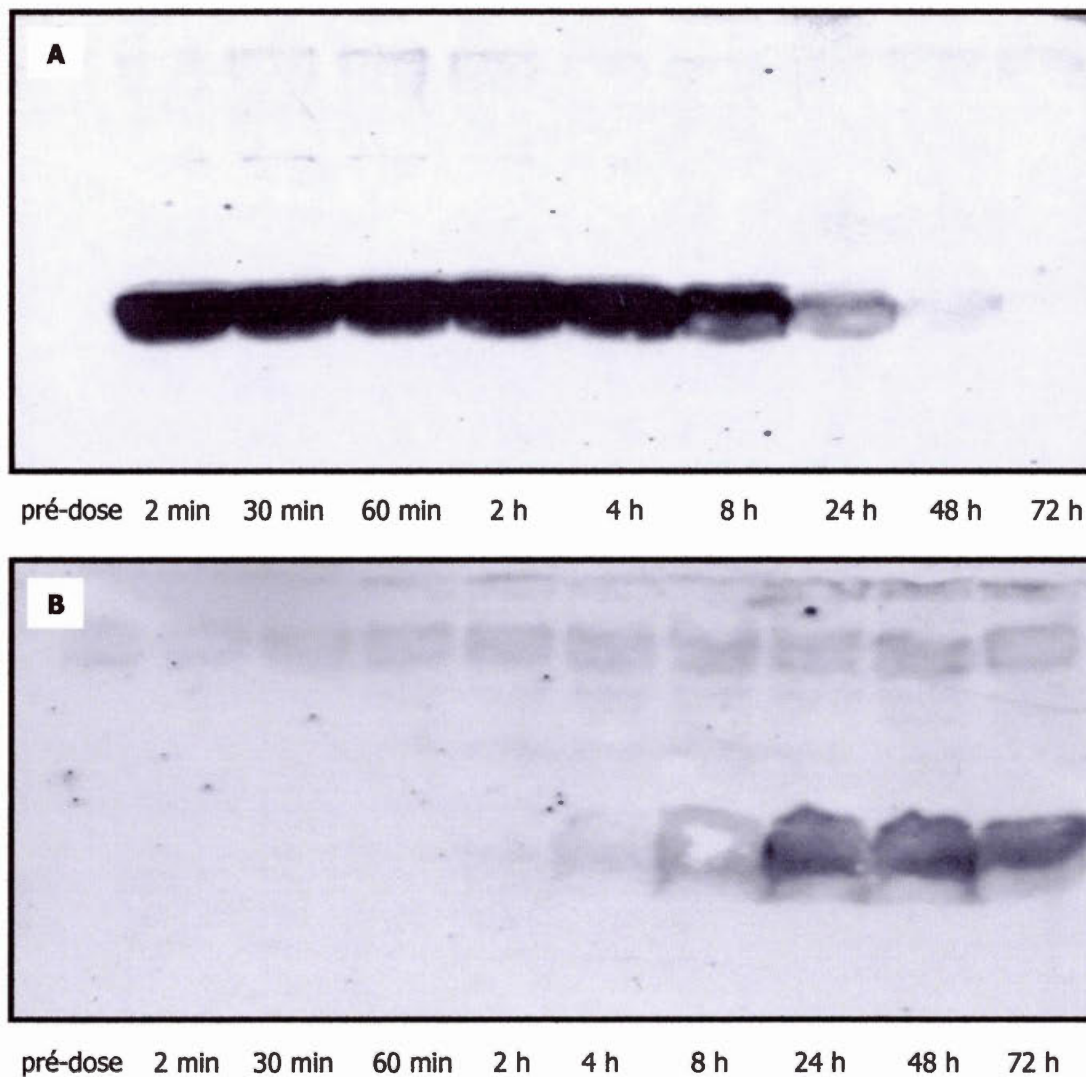
### 3.9 Analyse Western Blot de l'étude de pharmacocinétique

Les échantillons plasmatiques obtenus lors de la dernière étude de pharmacocinétique avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 et les conjugués pré-formés ont été utilisés afin de visualiser le profil pharmacocinétique par l'analyse Western blot. Chaque prélèvement intraveineux et sous-cutané (pré-dose, 2 min, 60 min, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h et 72 h) a migré sur gel et, par la suite, la détection a été effectuée avec un anticorps spécifique à l'exendin-4. Il est possible de comparer les profils intraveineux et sous-cutané pour chaque composé administré. Les composés injectés par voie intraveineuse possèdent un profil très semblable, c'est-à-dire qu'une bande large représentant, soit le composé CJC-1134 (DAC<sup>TM</sup> exendin-4) (figure 3.30a), le CJC-1730 (PC à l'albumine de rat) (figure 3.31a), le CJC-1249 (PC à l'albumine humaine (figure 3.32a) et le CJC-1734 (PC à l'albumine de rat du DAC<sup>TM</sup> N-terminal) (figure 3.33a) est visible à 2 minutes et s'estompe graduellement jusqu'à 72 heures. La différence se situe surtout au niveau des profils obtenus pour les échantillons sous-cutanés. On peut observer que le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 est détecté très tôt, soit au temps 30 minutes et que la concentration plasmatique s'estompe graduellement jusqu'à 72 heures (figure 3.30b). Pour les conjugués pré-formés, on commence à observer l'apparition des composés près de 4 heures suivant l'injection sous-cutanée, mais la bande visible est plutôt faible. Par contre, on peut observer une concentration plasmatique maximale entre 24 et 48 heures (figures 3.31b, 3.32b,

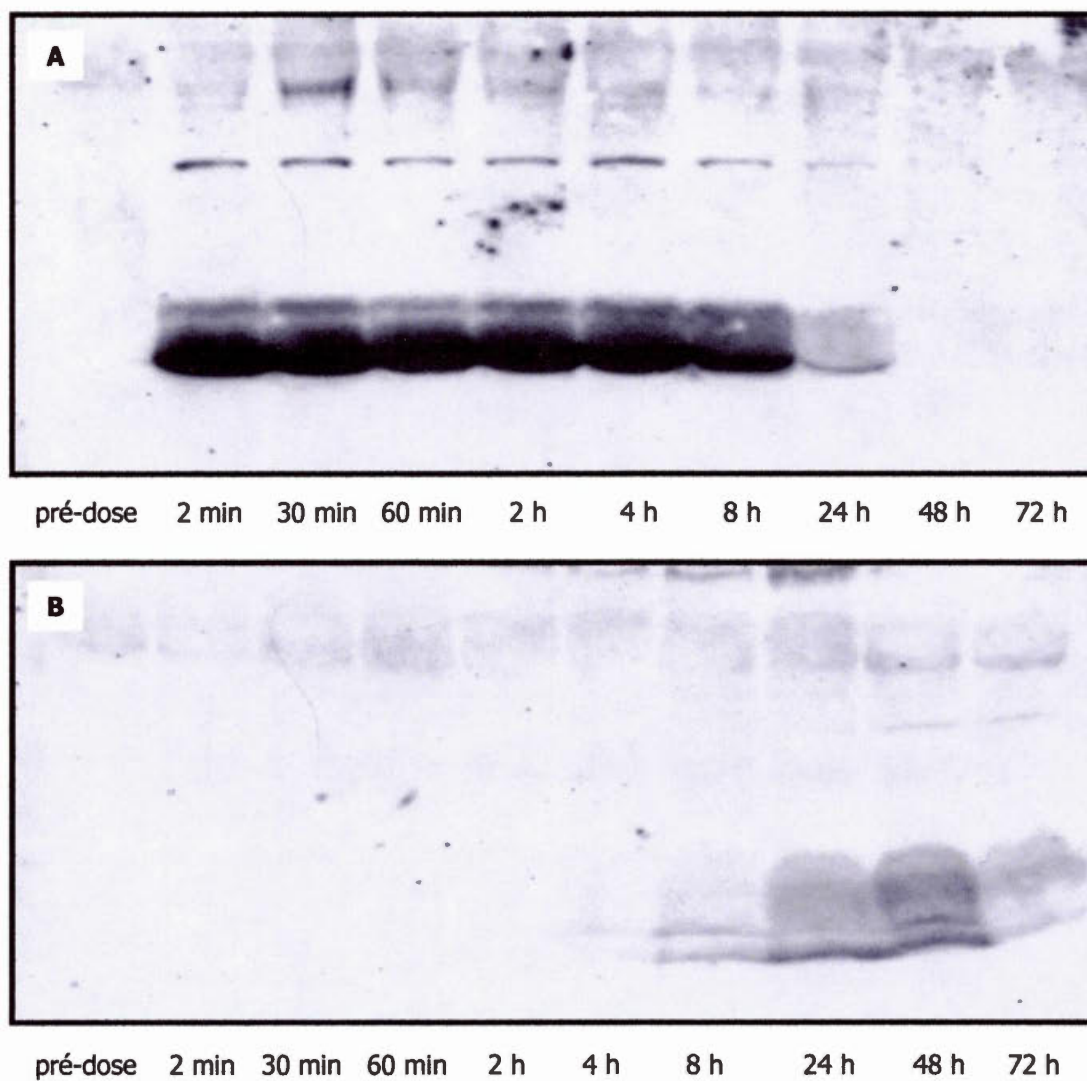


**Figure 3.30** Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés par voie intraveineuse (A) et sous-cutanée (B) avec le composé CJC-1134 (DAC™ exendin-4). Les échantillons iv ont été dilués 1/10 et les échantillons sc 1/2 avant d'être déposés sur le gel.

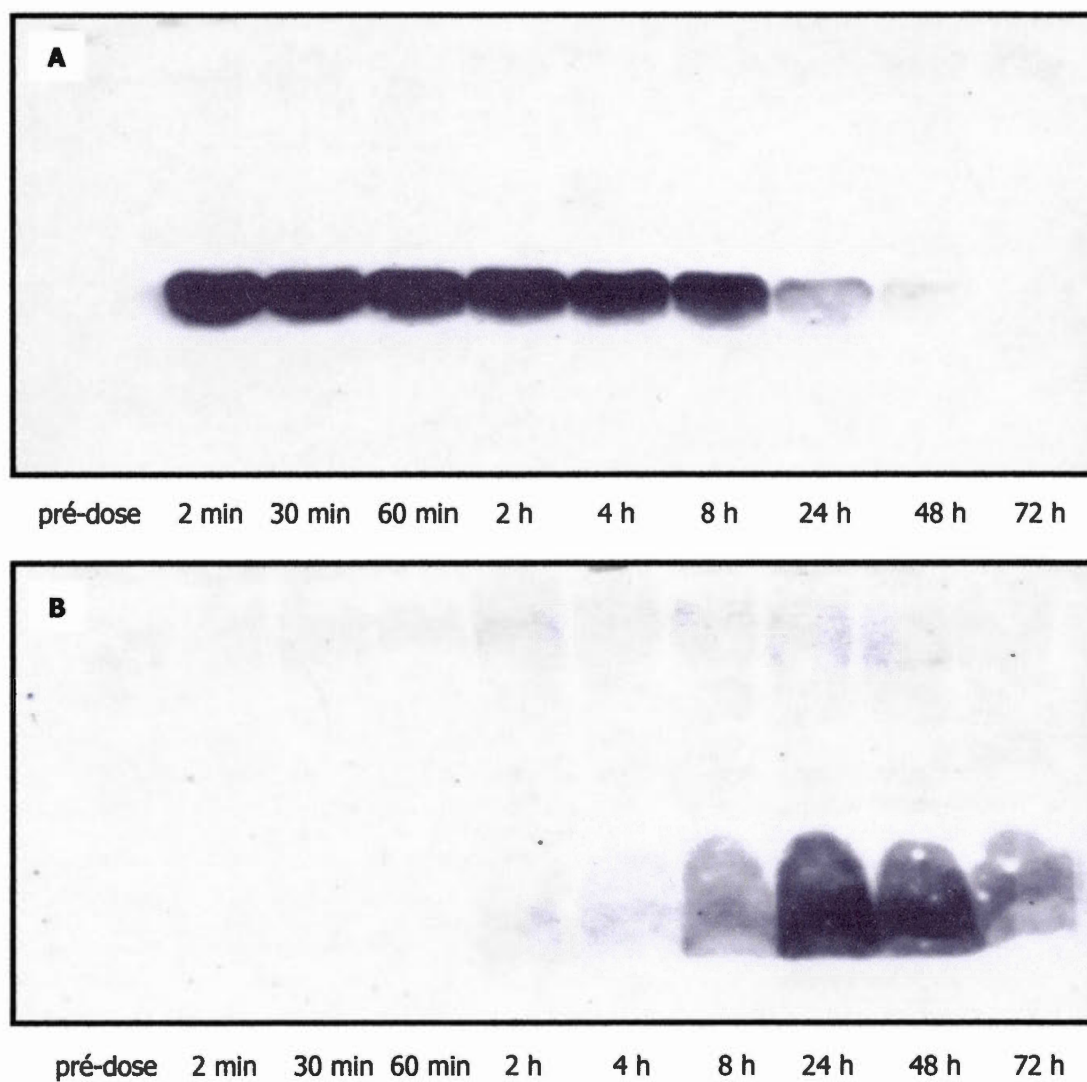




**Figure 3.31** Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés par voie intraveineuse (A) et sous-cutanée (B) avec le composé CJC-1730 (RSA:1134). Les échantillons iv ont été dilués 1/10 et les échantillons sc 1/2 avant d'être déposés sur le gel.



**Figure 3.32** Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés par voie intraveineuse (A) et sous-cutanée (B) avec le composé CJC-1249 (HSA:1134). Les échantillons iv ont été dilués 1/10 et les échantillons sc 1/2 avant d'être déposés sur le gel.



**Figure 3.33** Analyse Western Blot des échantillons plasmatiques de l'étude de pharmacocinétique des rats Sprague Dawley injectés par voie intraveineuse (A) et sous-cutanée (B) avec le composé CJC-1734 (RSA:1707). Les échantillons iv ont été dilués 1/10 et les échantillons sc 1/2 avant d'être déposés sur le gel.

3.33b) et qui diminue graduellement jusqu'à 72 heures. Les deux conjugués à l'albumine de rat (CJC-1730 et CJC-1734) semblent rester en circulation plus longtemps que le conjugué à l'albumine humaine (CJC-1249) puisque la bande à 72 heures est plus marquée. Il faut tenir compte aussi du fait que les échantillons intraveineux ont un facteur de dilution 1/10 et que les échantillons sous-cutanés ont un facteur de dilution de 1/2 lors de la migration.

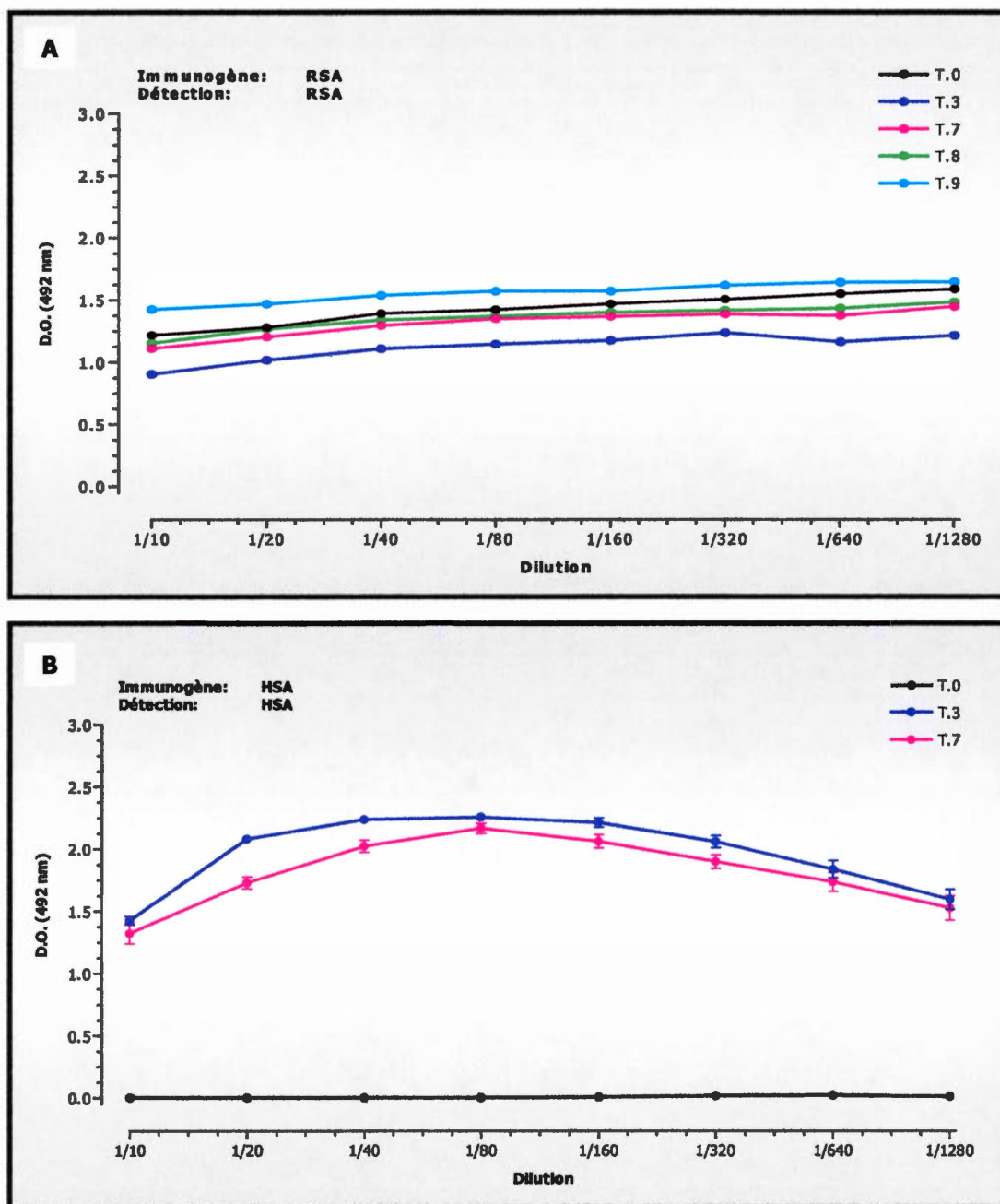
### 3.10 Évaluation de l'immunogénicité des dérivés de l'exendin-4 chez le rat Sprague Dawley

Un conjugué exendin-4 à l'albumine de rat (CJC-1730) a été tout spécialement synthétisé et purifié pour cette étude d'immunogénicité puisque le modèle animal utilisé était le rat. L'albumine humaine et le conjugué exendin-4 correspondant, étant des composés exogènes au modèle animal présent, servent de contrôles positifs puisque leur potentiel à stimuler la production d'anticorps est plutôt très élevé. L'exendin-4 native (CJC-1132) et le DAC<sup>TM</sup> correspondant (CJC-1134) permettent d'établir s'il y a effectivement présence d'une réponse immunitaire suite à des injections répétées. La réponse immunitaire est évaluée par la mesure des anticorps de type IgG présents dans les échantillons de sérum prélevés.

#### 3.10.1 Phase thérapeutique

Dans cette étude d'immunogénicité, la phase thérapeutique permet d'évaluer en premier lieu l'ampleur de la réponse immunitaire lorsque les composés sont injectés à des doses et selon un protocole thérapeutique. C'est-à-dire, qu'il n'y a aucune stimulation forcée de la réponse immunitaire par l'injection d'un adjuvant. Le protocole thérapeutique est pratiqué pendant une période de 28 jours, avec une injection par jour, et il se poursuit jusqu'à 64 jours avec une injection par semaine.

Premièrement, les injections d'albumine de rat et d'albumine humaine chez le rat produisent une réponse très différente. En effet, l'albumine de rat ne possède aucun



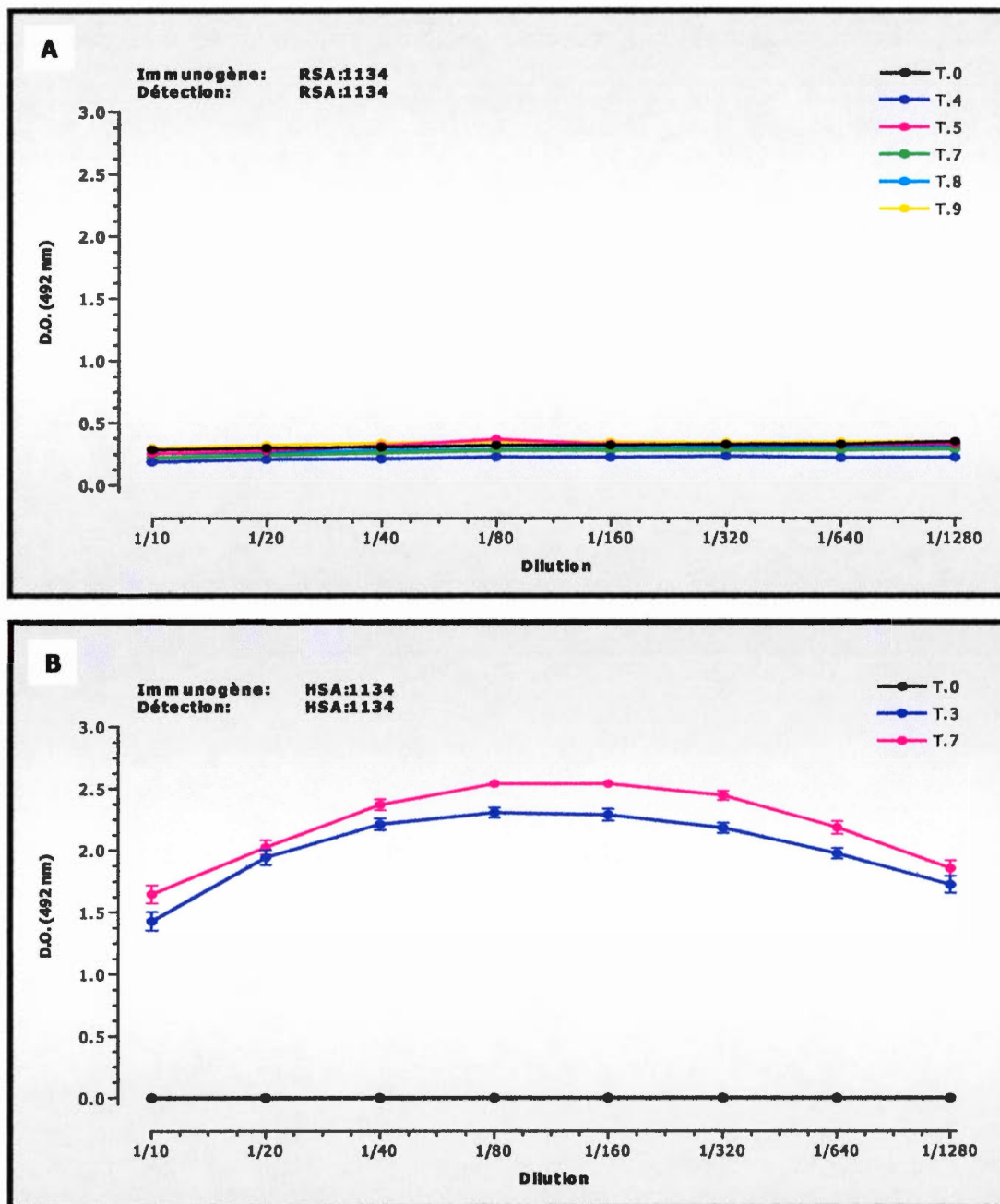
**Figure 3.34** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique des rats Sprague Dawley injectés avec (A) de l'albumine de rat (RSA) et (B) de l'albumine humaine (HSA). La détection a été effectuée en présence de RSA ou de HSA selon l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

potentiel immunogénique, comparativement à l'albumine humaine qui déclenche la formation d'anticorps très rapidement et avec un titre élevé à l'appui (figures 3.34 a et b). Le niveau basal du titre d'anticorps pour l'albumine de rat est élevé dû au fait que, lors de la purification de cette dernière, il n'a pas été possible d'éliminer tous les IgG présents naturellement. Il est particulièrement intéressant de noter l'absence d'immunogénicité du conjugué exendin-4 à l'albumine de rat (RSA:1134). Même les injections répétées ne stimulent pas la formation d'anticorps en comparaison avec l'injection du conjugué à l'albumine humaine (HSA:1134) (figure 3.35 a et b). Par contre, à des doses thérapeutiques et suite à des injections répétées, l'exendin-4 native (CJC-1132) et son DAC™ (CJC-1134) correspondant n'induisent aucune réponse immunitaire, ce qui est indiqué par un titre d'anticorps pratiquement nul à des dilutions très faibles (figures 3.36 a et b). Pour les anticorps produits chez les rats injectés avec le conjugué à l'albumine humaine, il a été possible d'évaluer si ces derniers étaient uniquement dirigés contre la partie albumine ou pouvaient aussi reconnaître l'exendin-4 comme antigène. Donc, lorsque la détection utilise l'exendin-4 native et le DAC™, on peut observer une réponse seulement lorsque le sérum immun est très peu dilué (figure 3.37 a et b). Par contre, lorsque la détection utilise le conjugué à l'albumine de rat, le titre d'anticorps est beaucoup plus élevé pour les mêmes dilutions (figure 3.38).

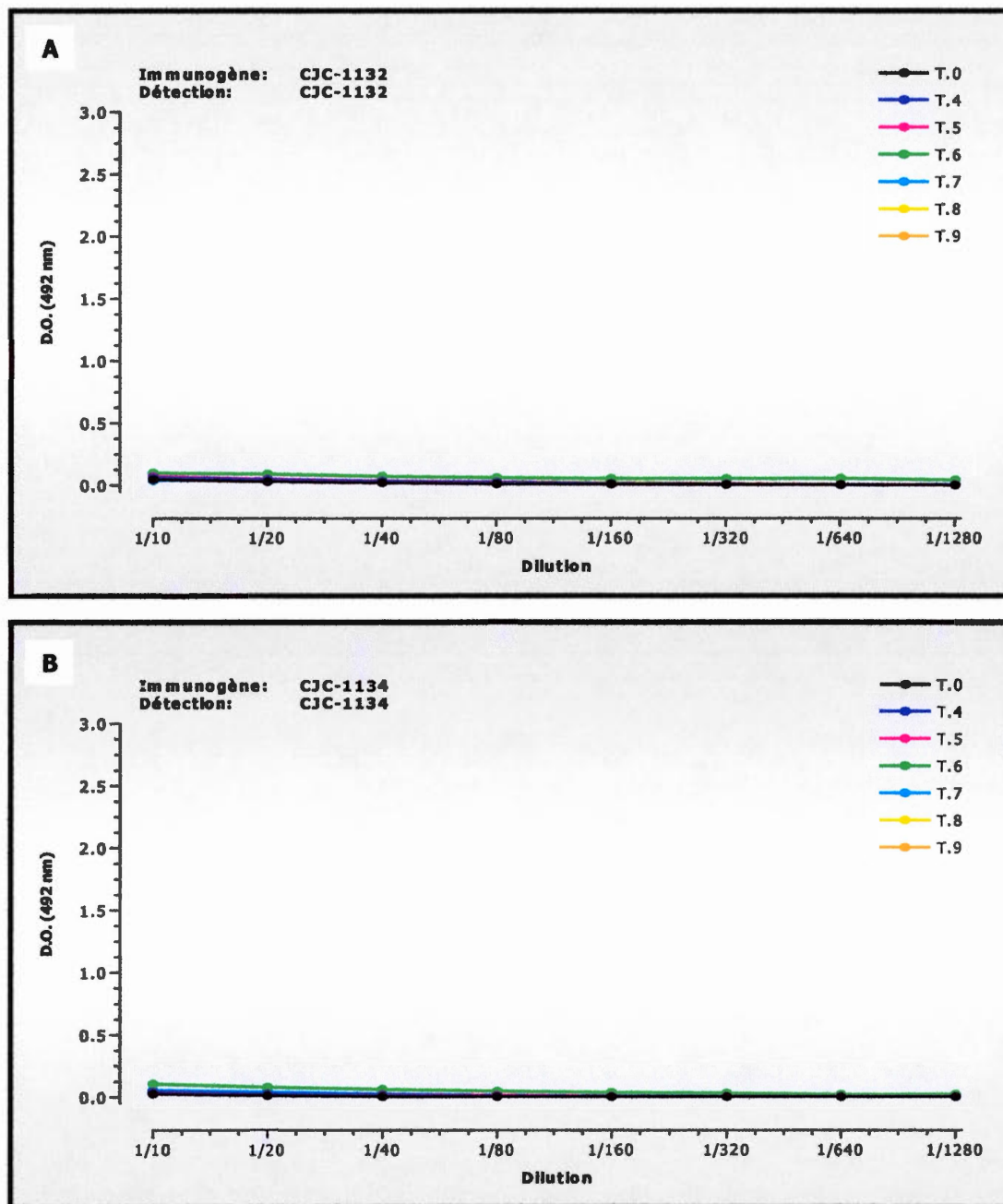
### 3.10.2 Première phase d'immunisation

Suite à la phase thérapeutique, l'étude de première phase d'immunisation a permis d'évaluer le potentiel immunogénique des dérivés de l'exendin-4 en stimulant la réponse immunitaire à l'aide d'un adjuvant. Les doses et le régime d'injection correspondent à un protocole commun d'immunisation. Encore une fois, il est possible d'observer l'absence de réponse immunitaire avec l'injection d'albumine de rat comparativement à la réponse obtenue lorsque les rats sont injectés avec de l'albumine humaine (figures 3.39 a et b). Même avec la stimulation forcée du

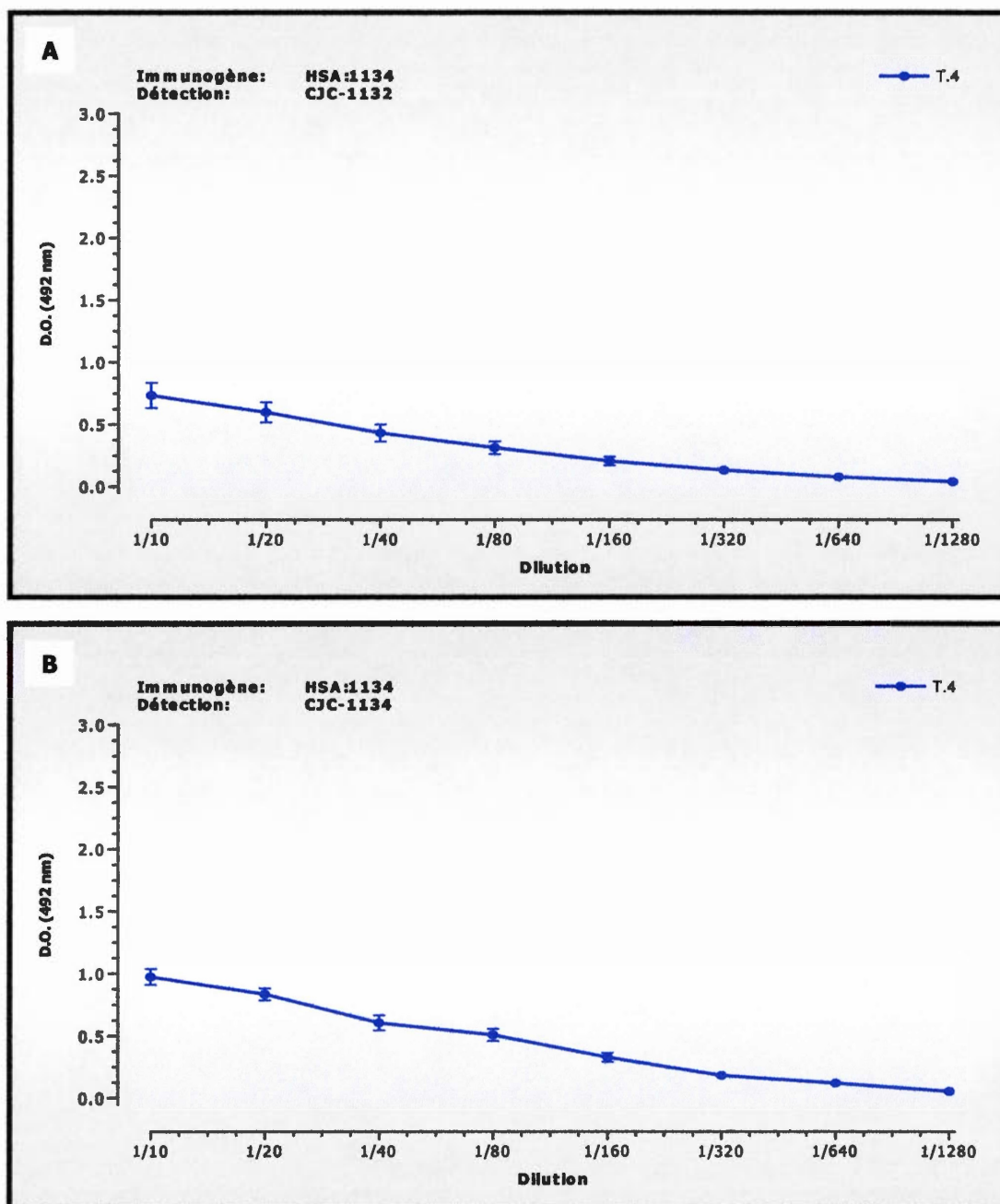




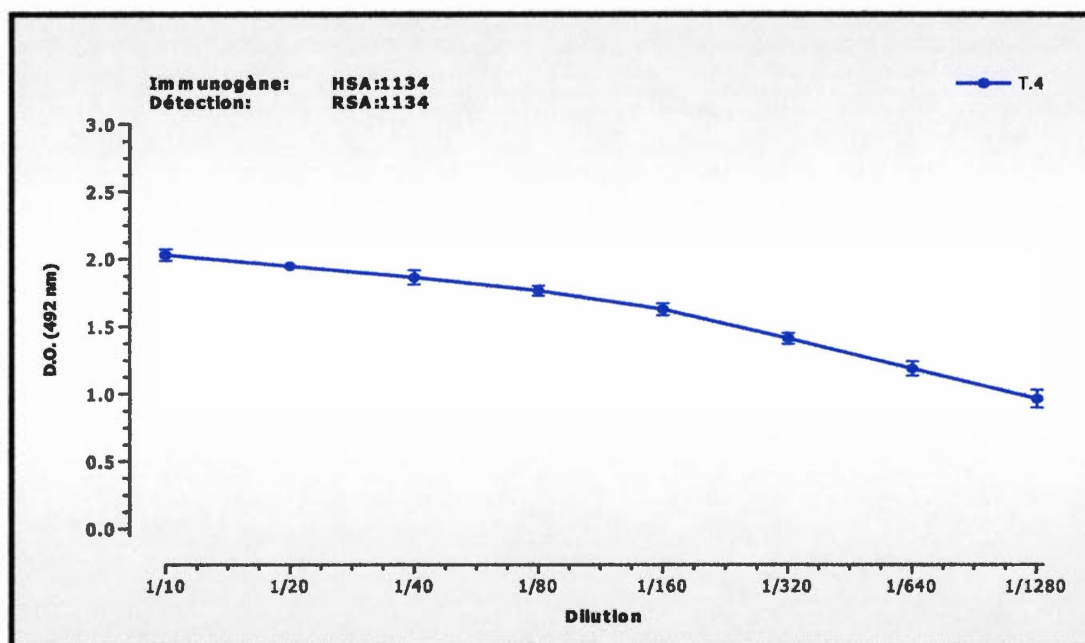
**Figure 3.35** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique des rats Sprague Dawley injectés avec (A) le conjugué exendin-4 à l'albumine de rat (RSA:1134) et (B) le conjugué exendin-4 à l'albumine humaine (HSA:1134). La détection a été effectuée en présence de RSA:1134 ou de HSA:1134 selon l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



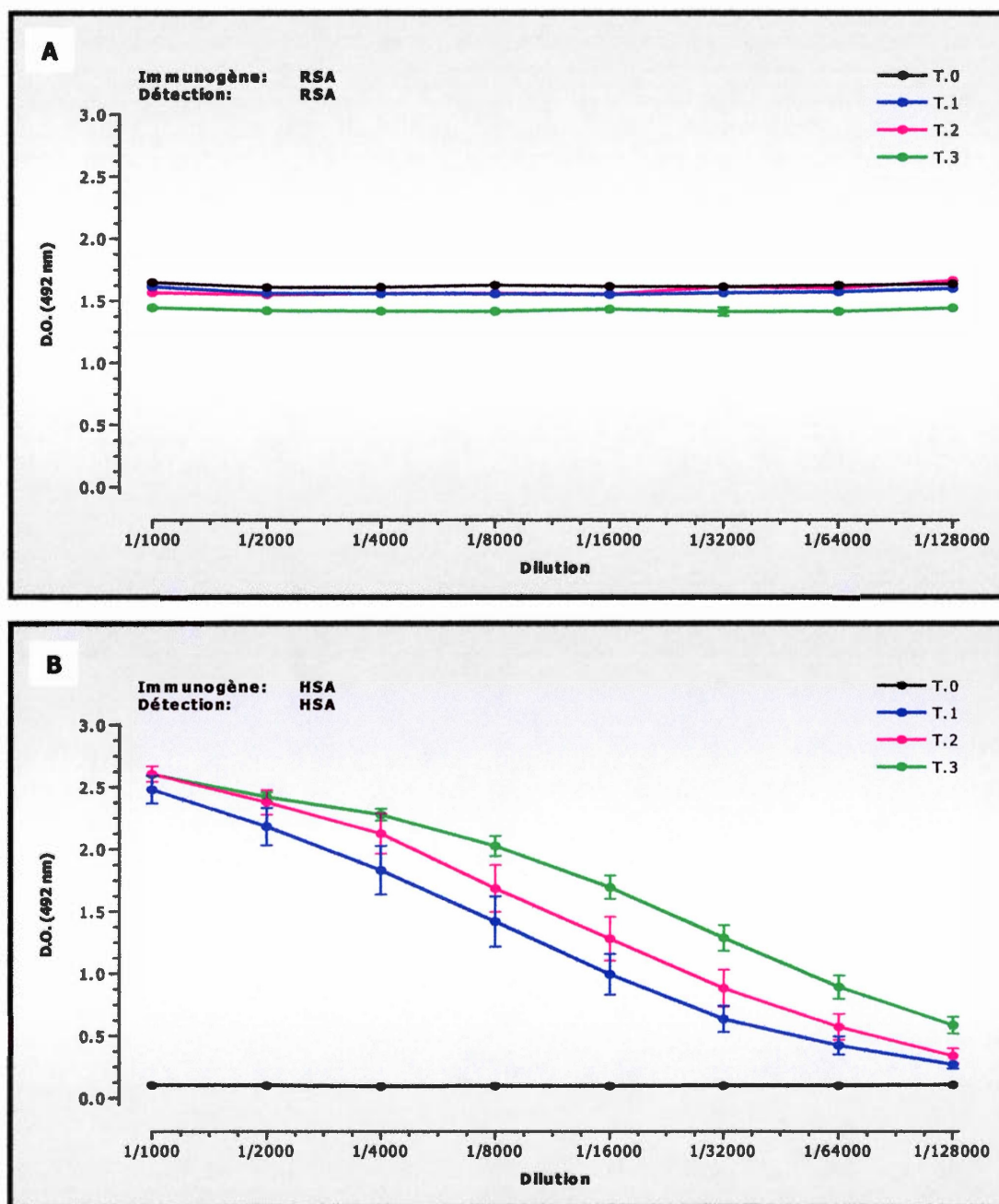
**Figure 3.36** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique des rats Sprague Dawley injectés avec (A) l'exendin-4 native (CJC-1132) et (B) le DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1134). La détection a été effectuée en présence de CJC-1132 ou de CJC-1134 selon l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



**Figure 3.37** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique. La détection a été effectuée en présence (A) de CJC-1132 et (B) de CJC-1134. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



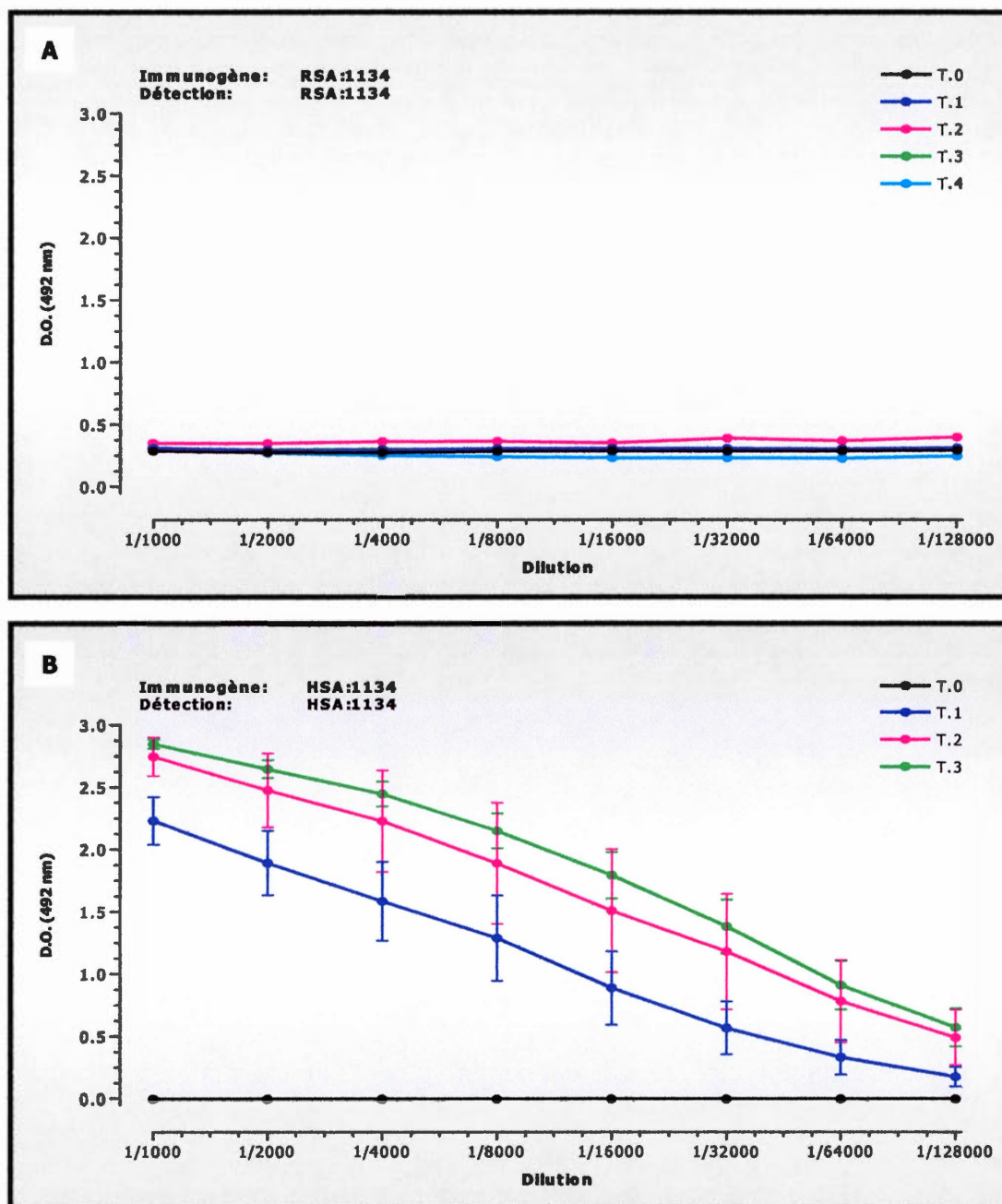
**Figure 3.38** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en phase thérapeutique. La détection a été effectuée en présence de RSA:1134. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



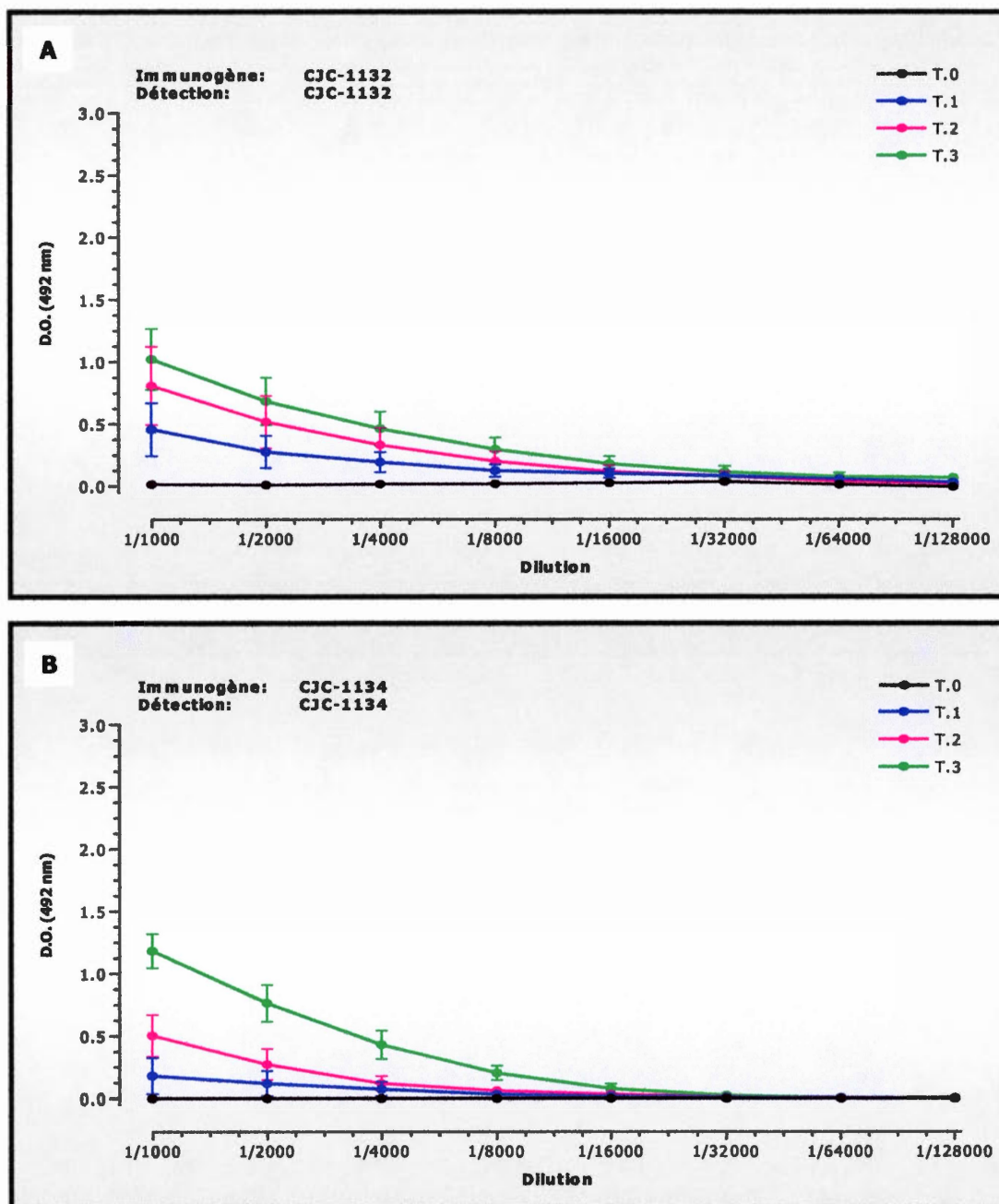
**Figure 3.39** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec (A) de l'albumine de rat (RSA) et (B) de l'albumine humaine (HSA). La détection a été effectuée en présence de RSA ou de HSA selon l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

système immunitaire, il n'y a encore aucune formation d'anticorps chez les rats injectés avec le conjugué exendin-4 à l'albumine de rat, comparativement au conjugué à l'albumine humaine (figures 3.40 a et b). Par contre, il y a stimulation de la réponse immunitaire lorsque les rats sont injectés avec l'exendin-4 native (CJC-1132) et le DAC<sup>TM</sup> (CJC-1134), ce que l'on n'observait pas lors de l'étude en phase thérapeutique. Même avec une dilution de 1/1000 on obtient un titre d'anticorps assez élevé (figures 3.41 a et b). Par la suite, plusieurs analyses ont été effectuées pour évaluer la réaction croisée entre les différents sérums et les différents antigènes. Les anticorps produits chez les rats injectés avec le composé HSA:1134 ne réagissent pas lorsque mis en présence de l'albumine de rat, ce qui est normalement attendu, mais ils vont réagir à l'albumine humaine (figure 3.42 a et b). Il a aussi été possible de vérifier si ces mêmes anticorps reconnaissent, non seulement la partie albumine humaine, mais aussi la partie exendin-4 (CJC-1132), ainsi que le DAC<sup>TM</sup> (CJC-1134). On peut observer que le titre d'anticorps est plutôt faible, comparativement à la réaction envers l'albumine humaine seulement (figure 3.43 a et b). Probablement qu'à des dilutions moindres, on observerait une meilleure réponse. Mis en présence de RSA:1134, l'amplitude du titre d'anticorps est semblable comme précédemment, mais avec une réaction un peu plus prononcée (figure 3.44a). Le sérum des rats injectés avec le composé RSA:1134 ne réagit pas lorsque mis en présence de HSA:1134 (figure 3.44b), de CJC-1132 et de CJC-1134 (figures 3.45 a et b). Même que les dilutions du sérum sont plus faibles pour s'assurer d'observer une réponse, s'il y a lieu. Les anticorps présents dans le sérum des rats injectés avec l'exendin-4 native (CJC-1132) réagissent très bien lorsque mis en présence du conjugué à l'albumine de rat et du conjugué à l'albumine humaine (figures 3.46 a et b). Ils reconnaissent aussi très bien le composé DAC<sup>TM</sup> (figure 3.47a). Il en est de même pour les rats injectés avec le DAC<sup>TM</sup>, les anticorps reconnaissant très bien l'exendin-4 libre (figure 3.47b), ainsi que les conjugués RSA:1134 et HSA:1134 (figures 3.48 a et b).

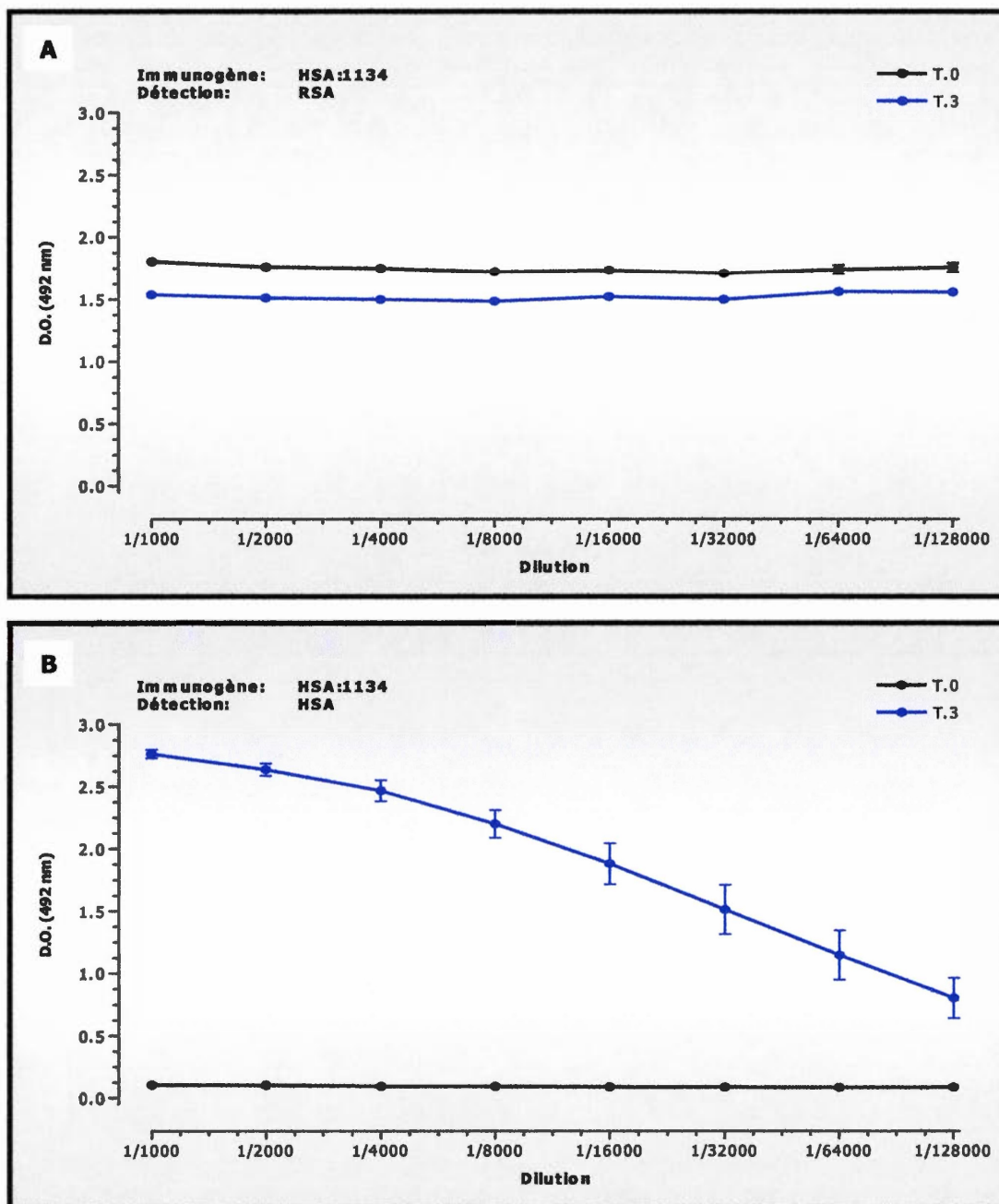




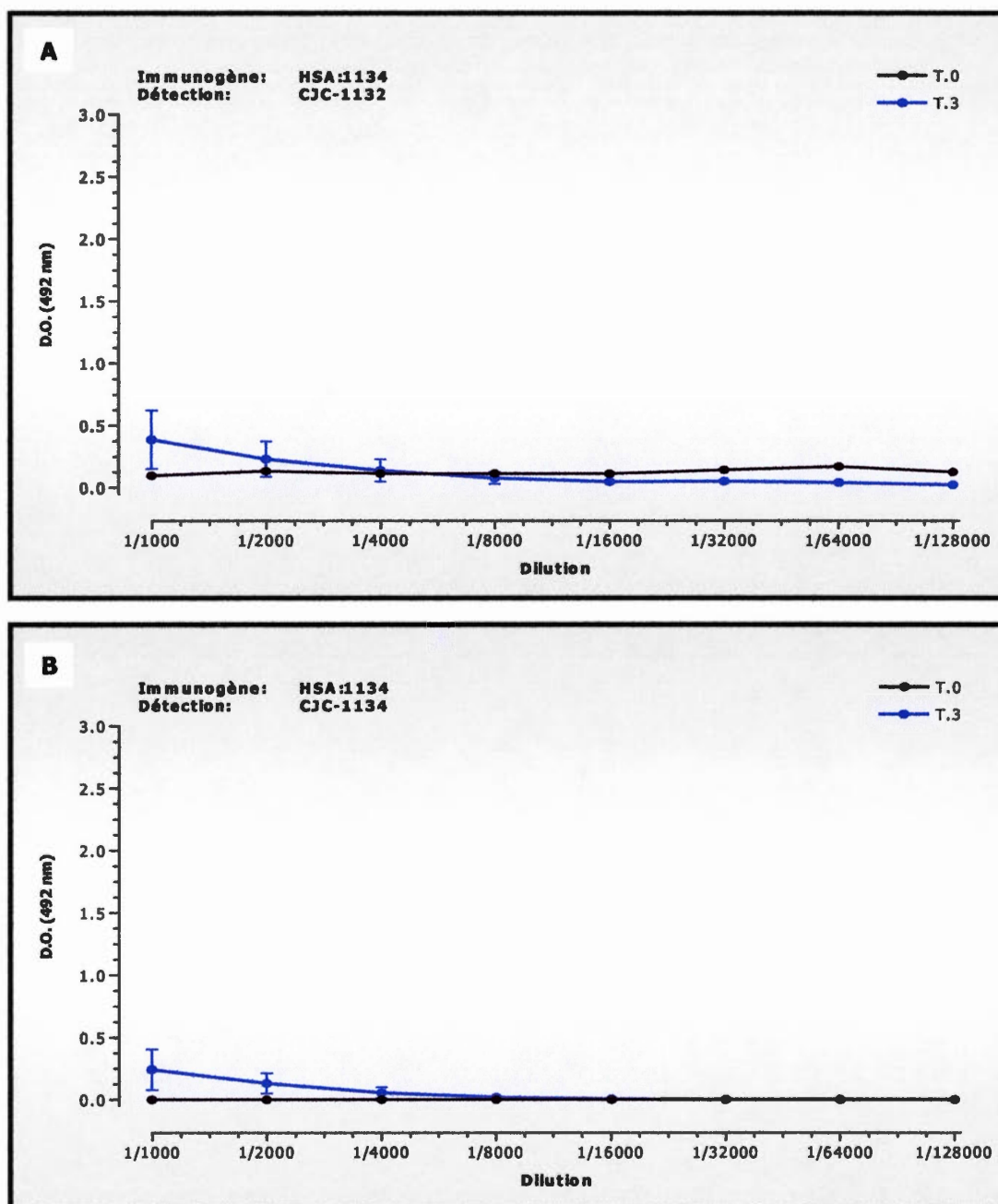
**Figure 3.40** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec (A) le conjugué exendin-4 à l'albumine de rat (RSA:1134) et (B) le conjugué exendin-4 à l'albumine humaine (HSA:1134). La détection a été effectuée en présence de RSA:1134 ou de HSA:1134 selon l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



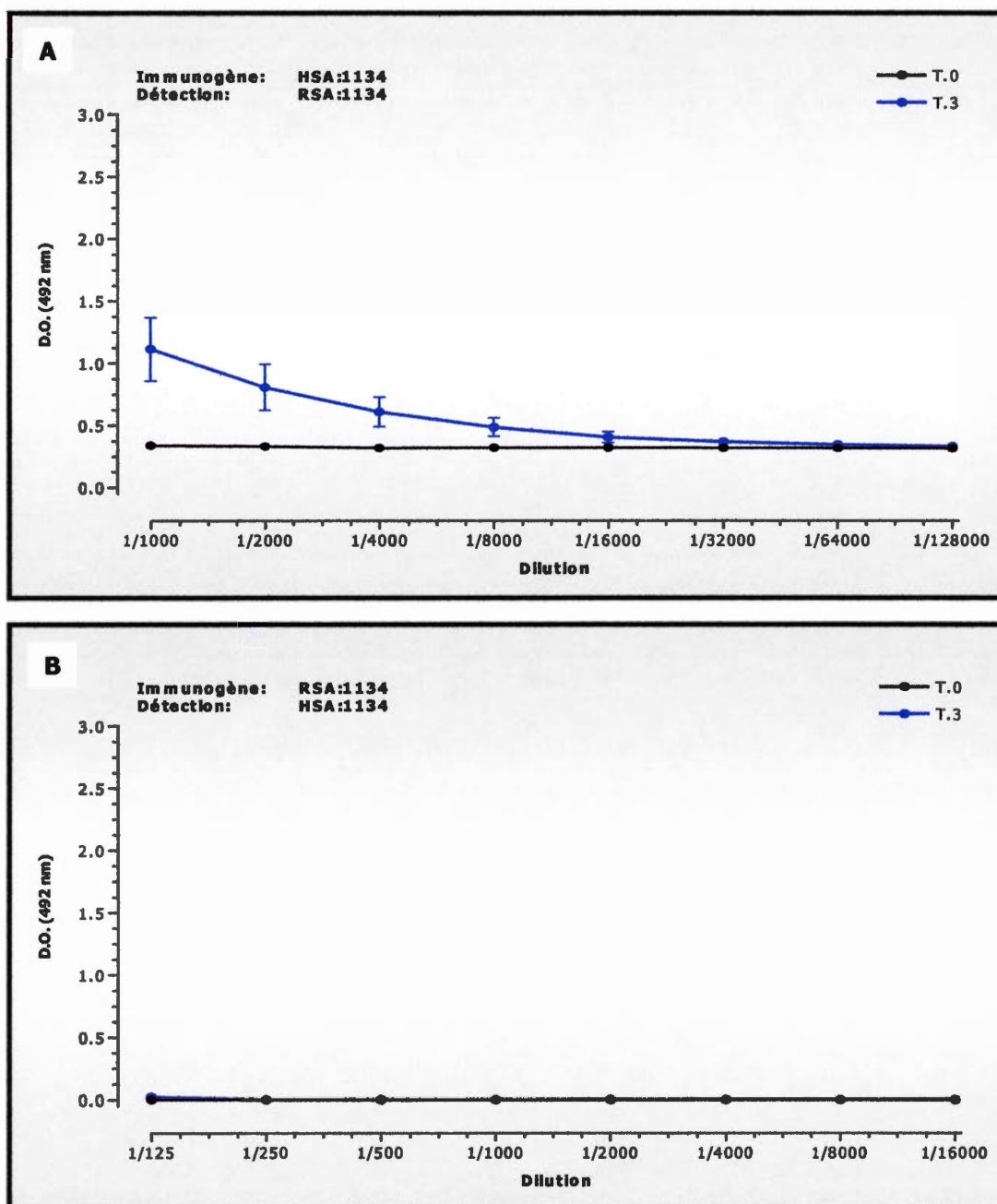
**Figure 3.41** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec (A) l'exendin-4 native (CJC-1132) et (B) le DAC™ exendin-4 (CJC-1134). La détection a été effectuée en présence de CJC-1132 ou de CJC-1134 selon l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



**Figure 3.42** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de RSA et (B) de HSA. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

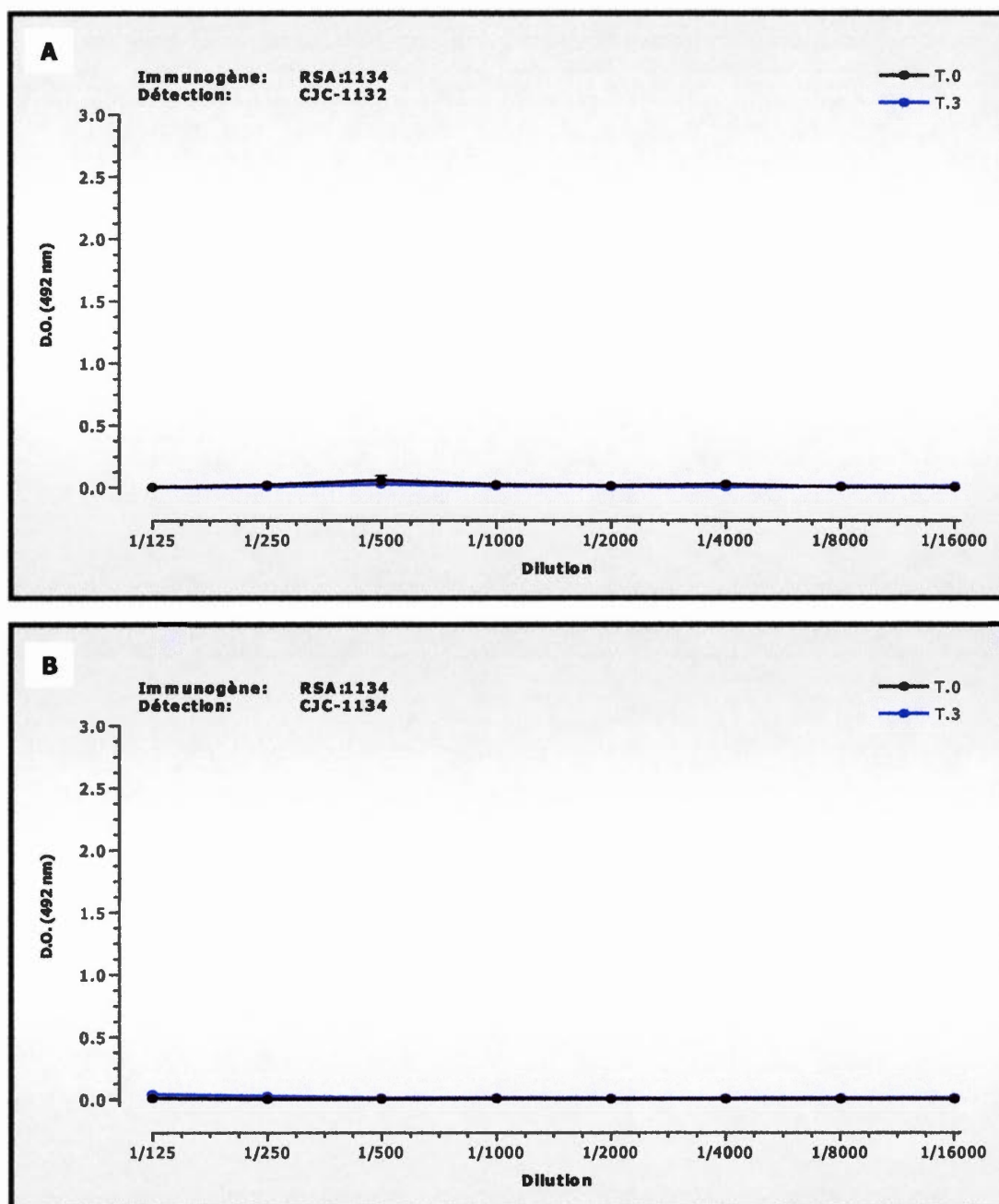


**Figure 3.43** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de CJC-1132 et (B) de CJC-1134. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



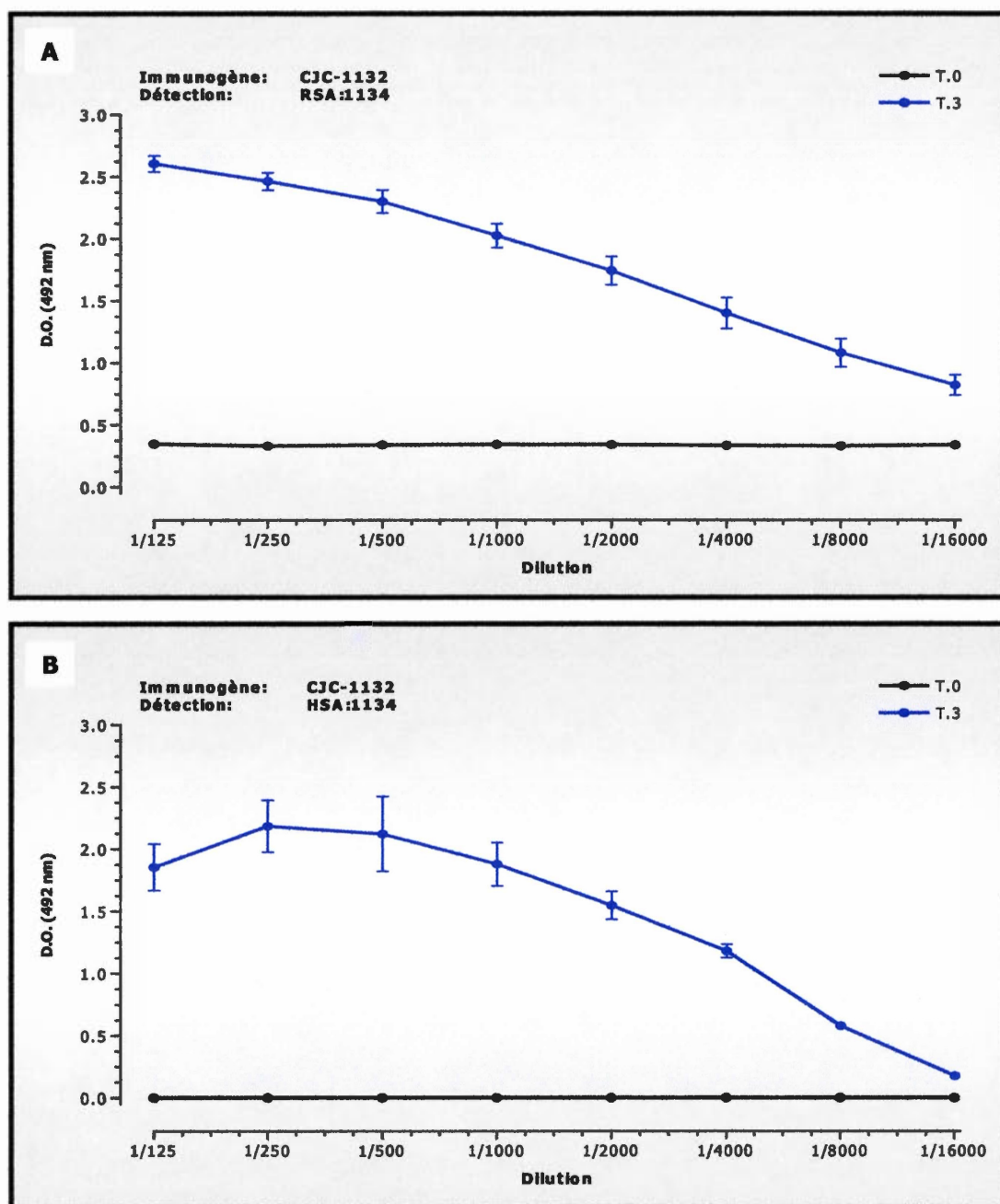
**Figure 3.44** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec (A) du HSA:1134 et (B) du RSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de RSA:1134 et (B) de HSA:1134. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



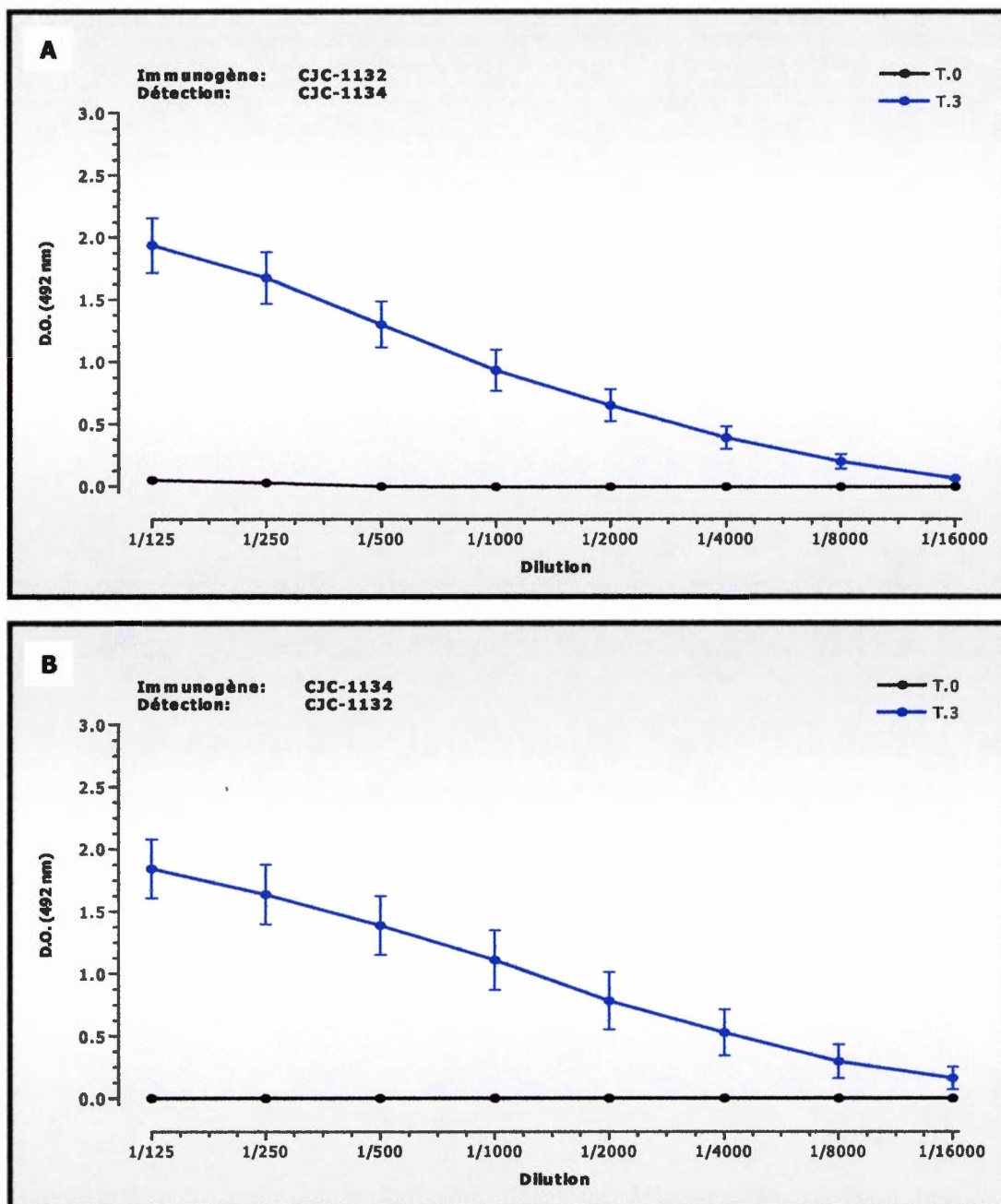


**Figure 3.45** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du RSA:1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de CJC-1132 et (B) de CJC-1134. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

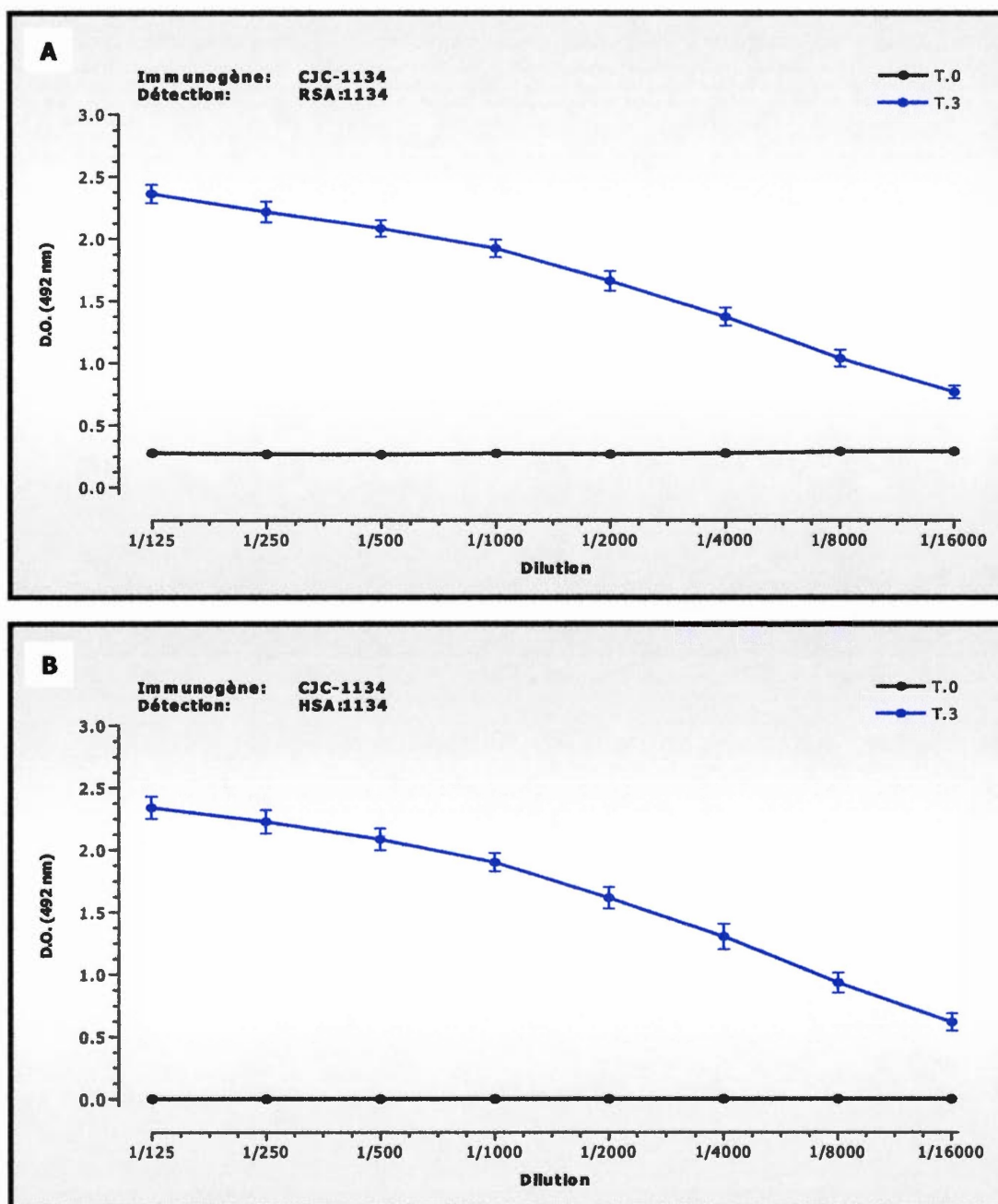




**Figure 3.46** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1132 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de RSA:1134 et (B) de HSA:1134. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



**Figure 3.47** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec (A) du CJC-1132 et (B) du CJC-1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de CJC-1134 et (B) de CJC-1132. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

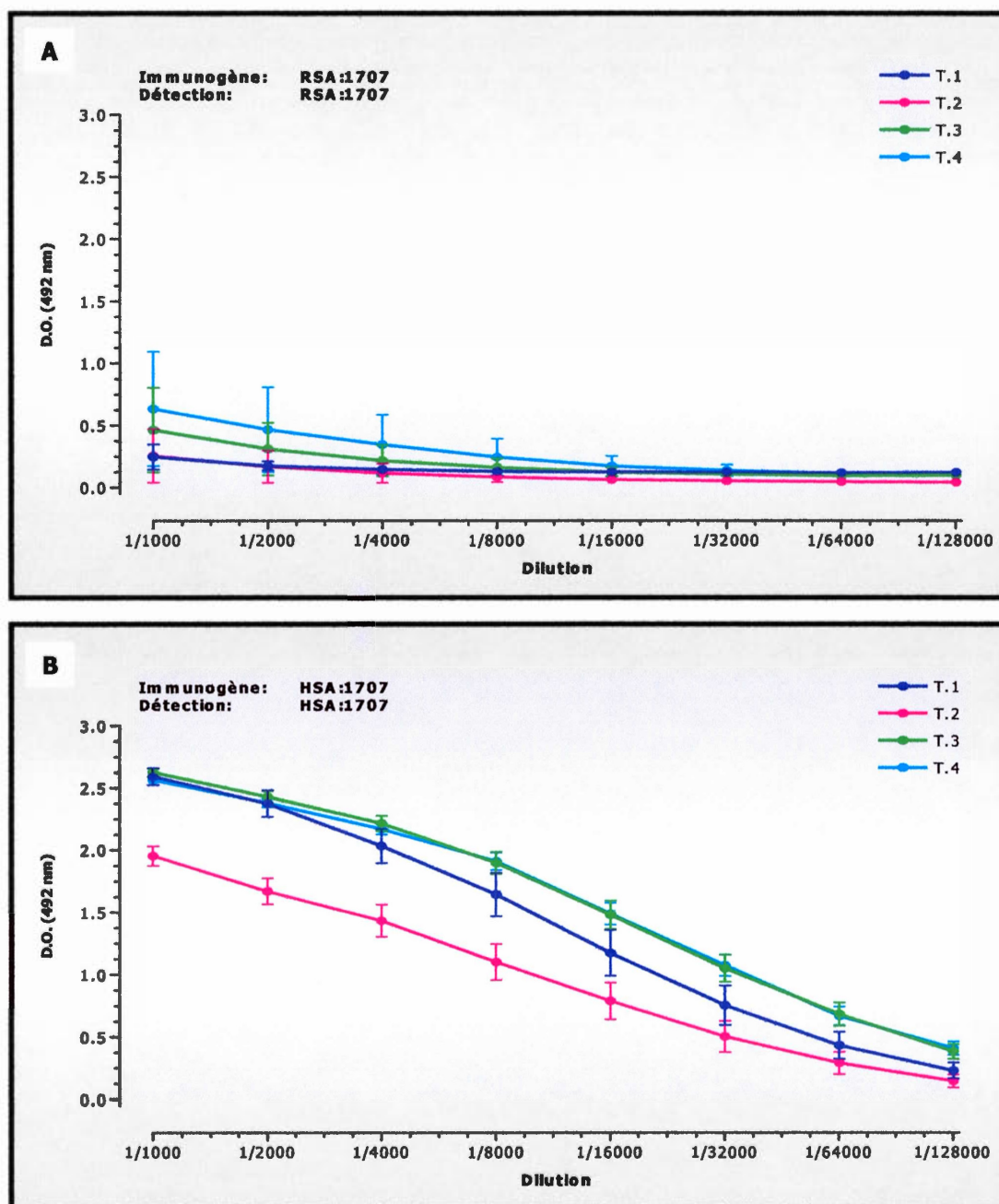


**Figure 3.48** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1134 lors de l'étude d'immunogénicité en première phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de RSA:1134 et (B) de HSA:1134. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

### 3.10.3 Deuxième phase d'immunisation

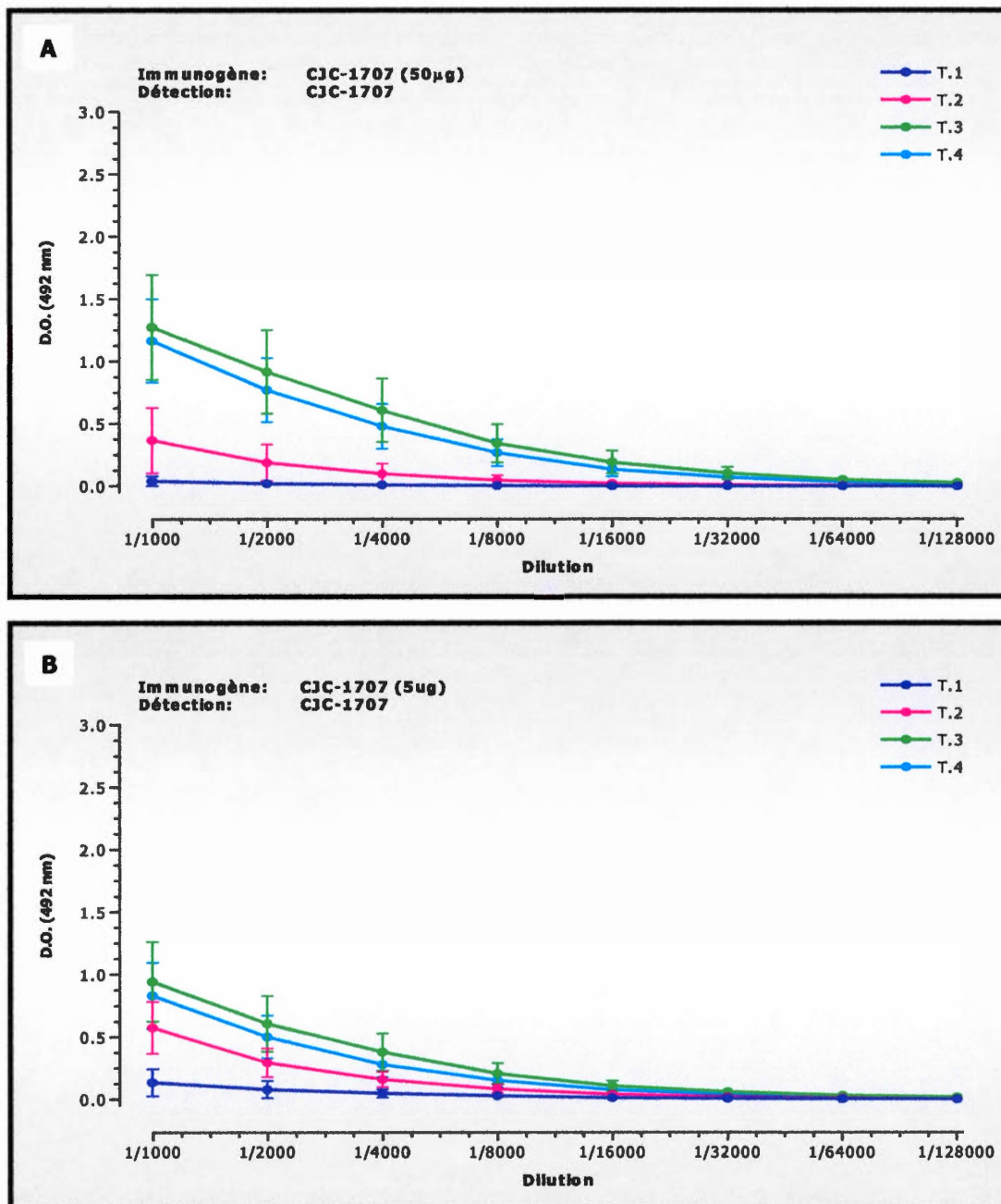
Le but de cette seconde phase d'immunisation était d'évaluer le potentiel immunogène d'un DAC<sup>TM</sup> exendin-4 et de son conjugué à l'albumine de rat, dont la partie réactive pour l'attachement à l'albumine se situe à la partie N-terminale du peptide, et non en C-terminal comme les autres composés. De plus, l'effet de deux doses du nouveau DAC<sup>TM</sup> (CJC-1707) (50 µg et 5 µg) est aussi évalué, basé sur le potentiel à stimuler la réponse immunitaire. Le potentiel immunogène de l'exendin-4 libre est aussi réévalué, mais à une dose beaucoup plus faible, soit de 5 µg.

Comparativement à l'étude précédente, les rats injectés avec le conjugué à l'albumine de rat RSA:1707 manifestent un début de réaction immunitaire face au composé. L'amplitude du titre d'anticorps n'est pas prononcée comme la réaction engendrée lorsque les rats sont injectés avec le conjugué à l'albumine humaine HSA:1707 (figures 3.49 a et b). Il est à noter que le titre d'anticorps représenté est la moyenne des 4 rats injectés avec le même composé. En fait, il y a seulement un rat sur les quatre dont le système immunitaire a produit des anticorps contre le RSA:1707 dès la première injection, ce qui peut s'observer par l'écart prononcé de l'erreur standard à la moyenne (SEM). Un second rat démontre aussi un début de réaction immunitaire, mais seulement après la cinquième injection, tandis que les deux autres rats ne réagissent aucunement au composé. L'injection du DAC<sup>TM</sup> CJC-1707 aux deux différentes doses provoque facilement la formation d'anticorps chez tous les rats. Seulement, l'amplitude des réponses diffère d'un rat à l'autre, ce qui se manifeste par des écarts plus grands de l'erreur standard à la moyenne (figures 3.50 a et b). Il y a seulement une petite différence au niveau du titre d'anticorps généré par la dose de 50 µg versus celle de 5 µg. Par contre, les rats injectés avec l'exendin-4 libre à une dose de 5 µg réagissent beaucoup moins que lors de la première phase d'immunisation quand la dose injectée était de 50 µg (figure 3.51). Il y a même des rats dans le groupe qui ne réagissent aucunement au composé. La réaction provient



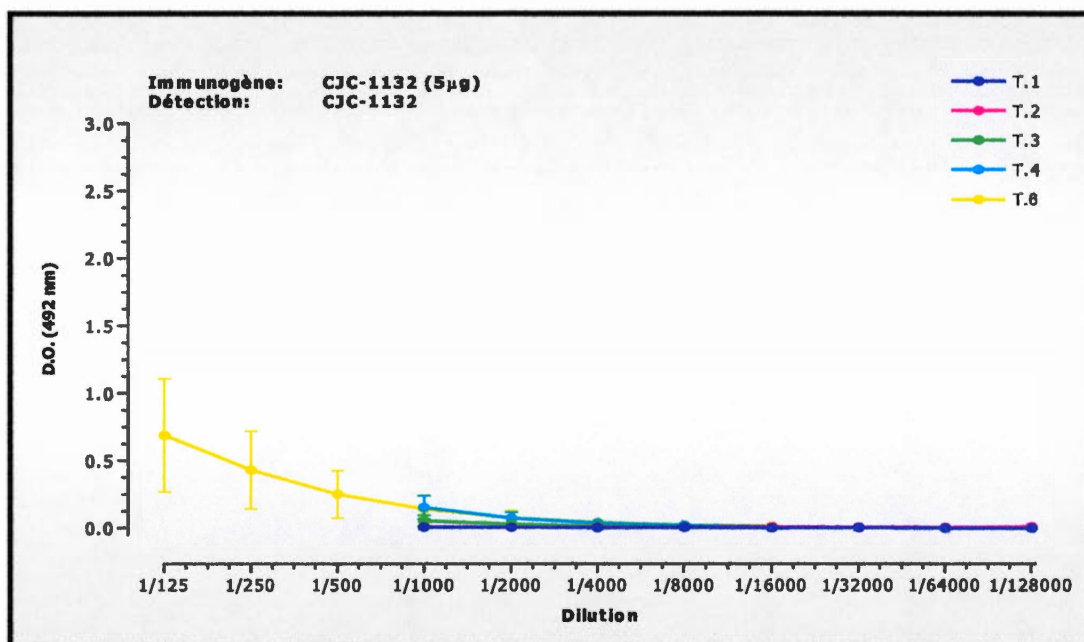
**Figure 3.49** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec (A) le RSA:1707 et (B) le HSA:1707. La détection a été effectuée en présence de RSA:1707 ou de HSA:1707 selon l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.





**Figure 3.50** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec (A) le DAC™ CJC-1707 à une dose de 50 µg et (B) le DAC™ CJC-1707 à une dose de 5 µg. La détection a été effectuée en présence de CJC-1707, l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

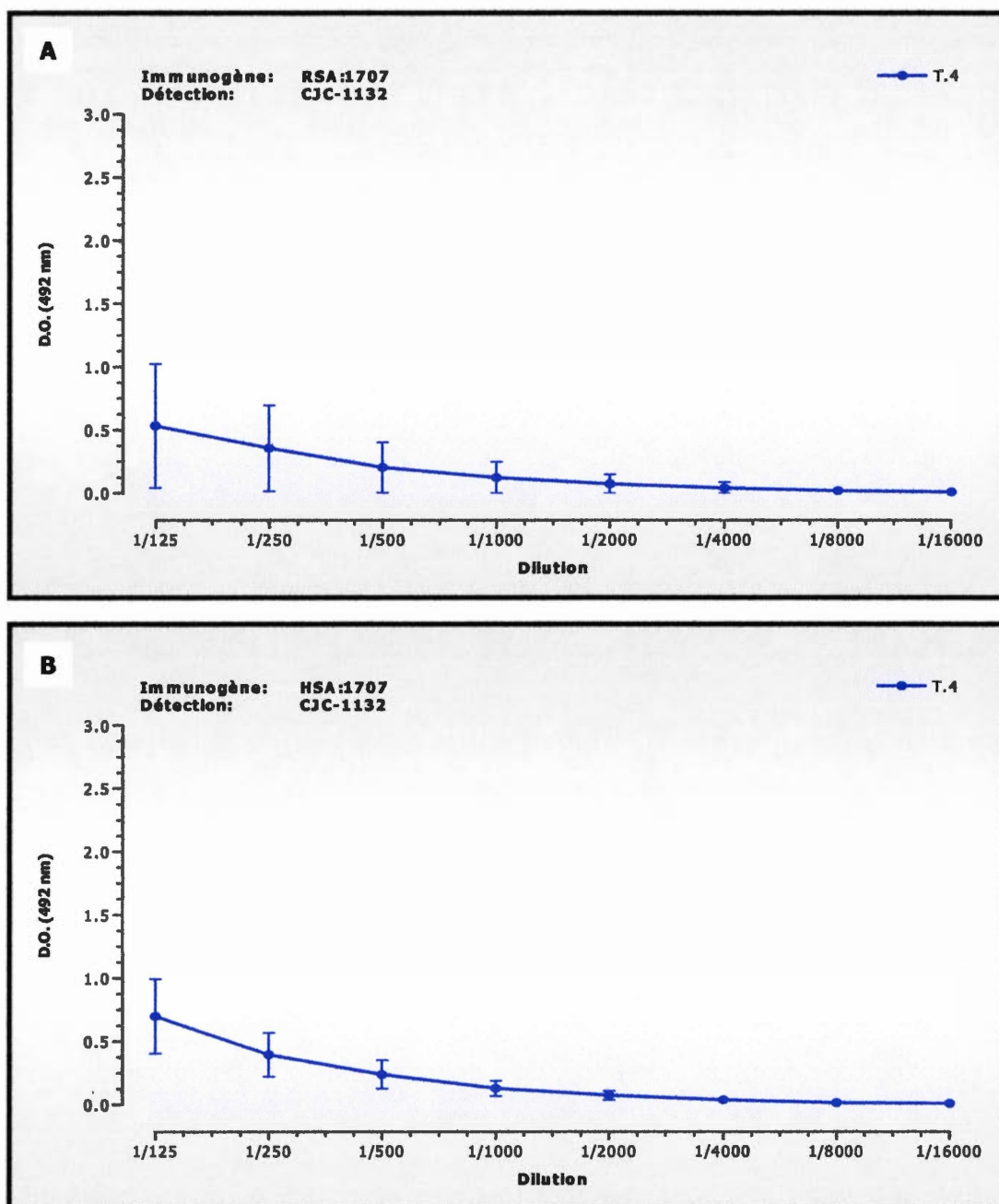




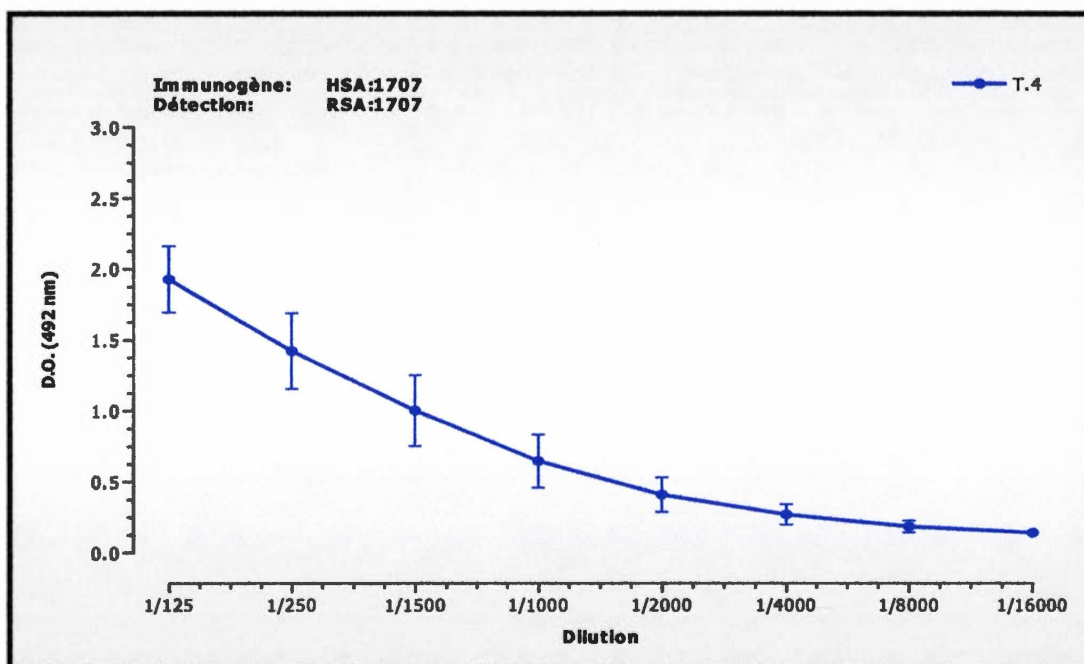
**Figure 3.51** Évaluation de la production d'anticorps lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation des rats Sprague Dawley injectés avec l'exendin-4 native (CJC-1132) à une dose de 5 µg. La détection a été effectuée en présence de CJC-1132, l'antigène de départ. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

de deux rats seulement et après plusieurs injections du composé. Même que le sérum doit être beaucoup moins dilué pour observer une réponse.

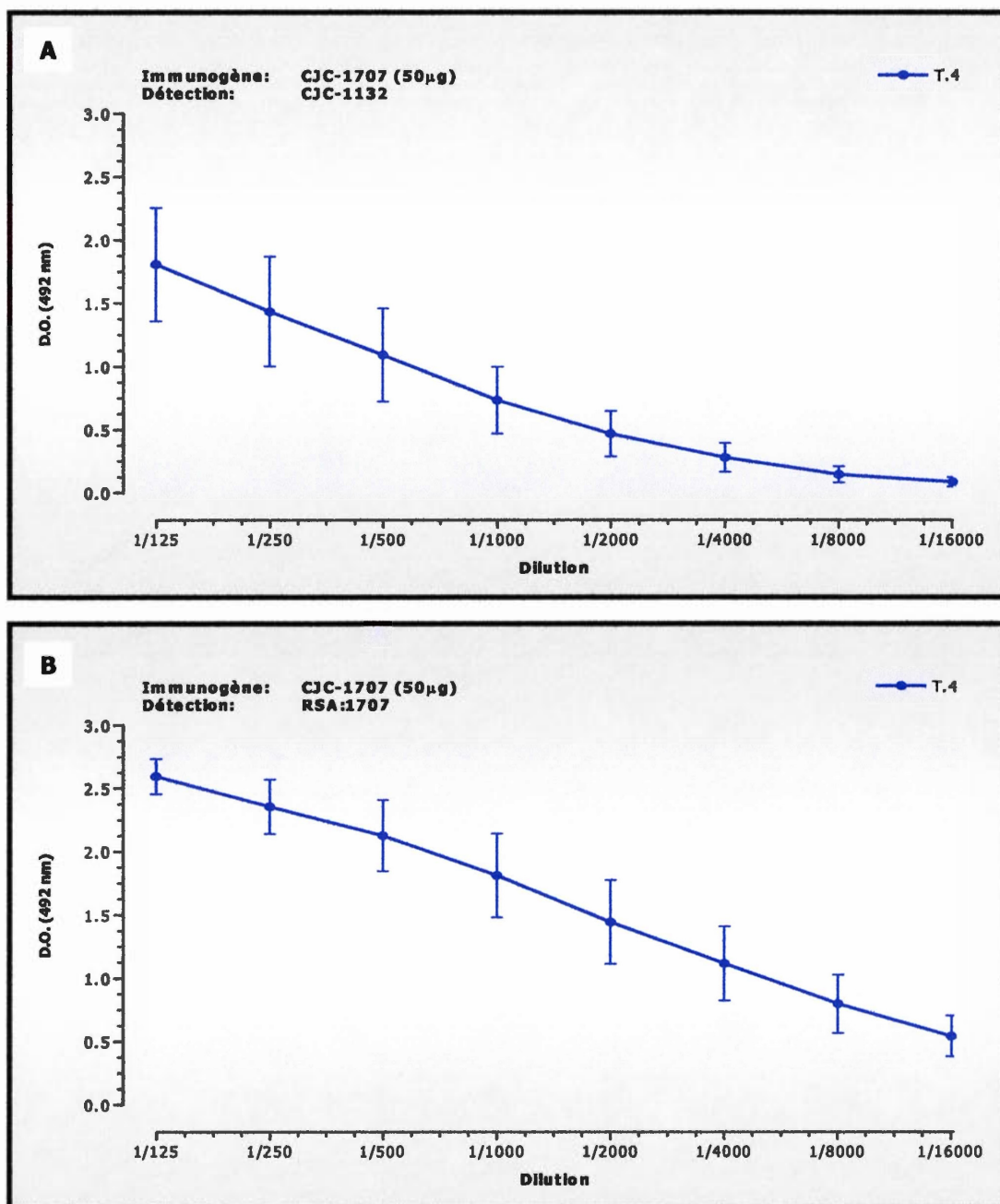
L'analyse des réactions croisées permet d'observer que les anticorps produits chez les rats injectés avec le composé RSA:1707 réagissent en présence d'exendin-4 libre (CJC-1132), mais seulement chez les deux rats ayant produit une réponse immunitaire précédemment (figure 3.52a). Il en est de même pour les rats injectés avec le composé HSA:1707 (figure 3.52b). On peut observer un titre d'anticorps plus élevé quand le sérum des rats injectés avec le conjugué à l'albumine humaine est mis en présence de RSA:1707 (figure 3.53). Ce même phénomène pouvait aussi être observé au cours de la première phase d'immunisation avec le composé HSA:1134 en présence de CJC-1132, CJC-1134 et de RSA:1134 (figures 3.43 a et b ; figure 3.44 a). Les anticorps produits lorsque les rats ont été injectés avec le DAC™ CJC-1707 à des doses de 50 µg et 5 µg reconnaissent bien l'exendin-4 libre (CJC-1132) (figures 3.54a et 3.55a), mais réagissent encore mieux avec le conjugué à l'albumine de rat RSA:1707 (figures 3.54b et 3.55 b). Les anticorps qui ont été produits chez les deux rats du groupe injectés avec le composé exendin-4 libre (CJC-1132) à faible dose de 5 µg, réagissent en présence du conjugué à l'albumine de rat (figure 3.56). La réaction est d'une plus grande amplitude en comparaison avec la réaction initiale où les anticorps sont mis en présence de CJC-1132, l'antigène d'injection (figure 3.51).



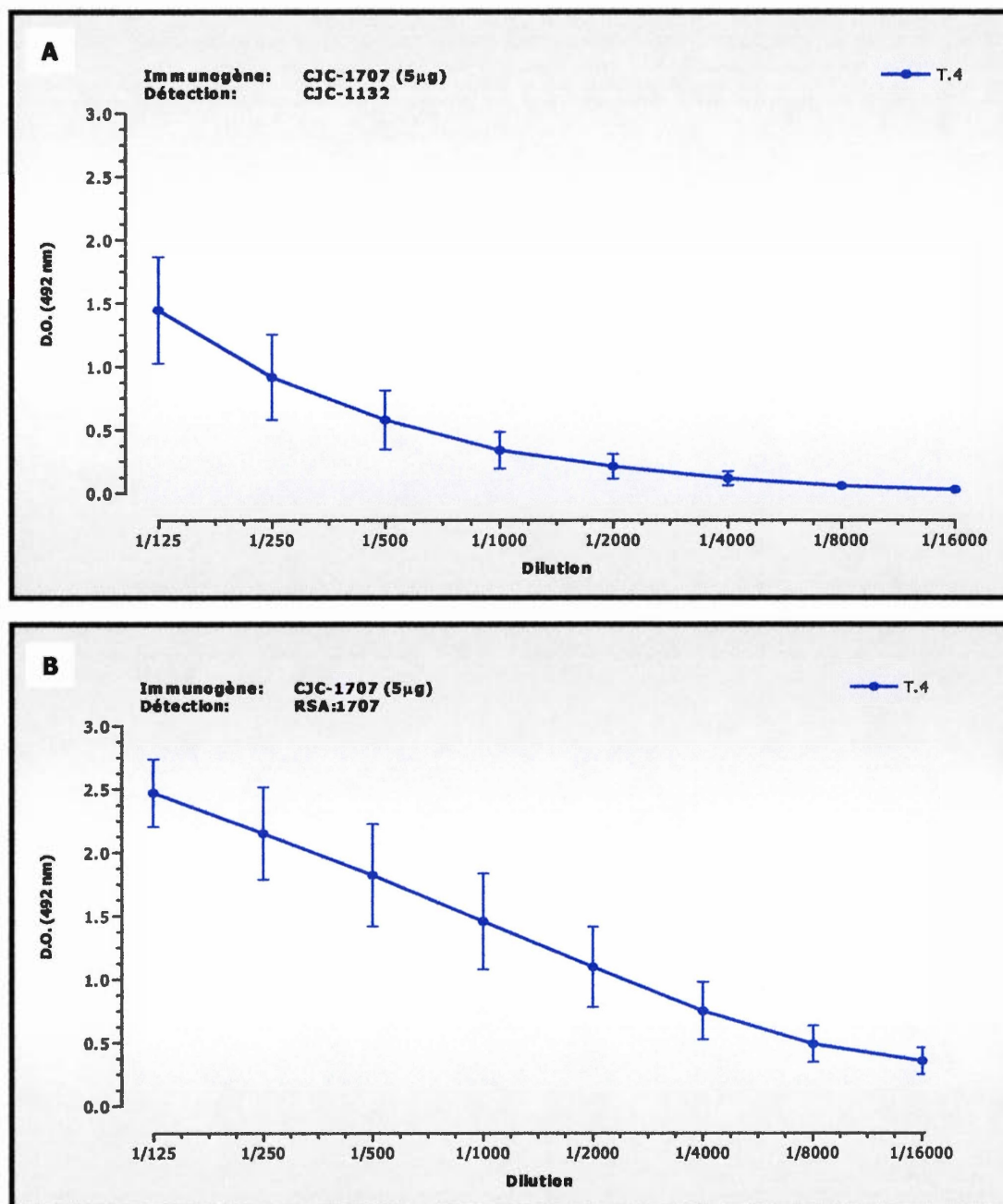
**Figure 3.52** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec (A) du RSA:1707 et (B) du HSA:1707 lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence de CJC-1132. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



**Figure 3.53** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du HSA:1707 lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence de RSA:1707. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

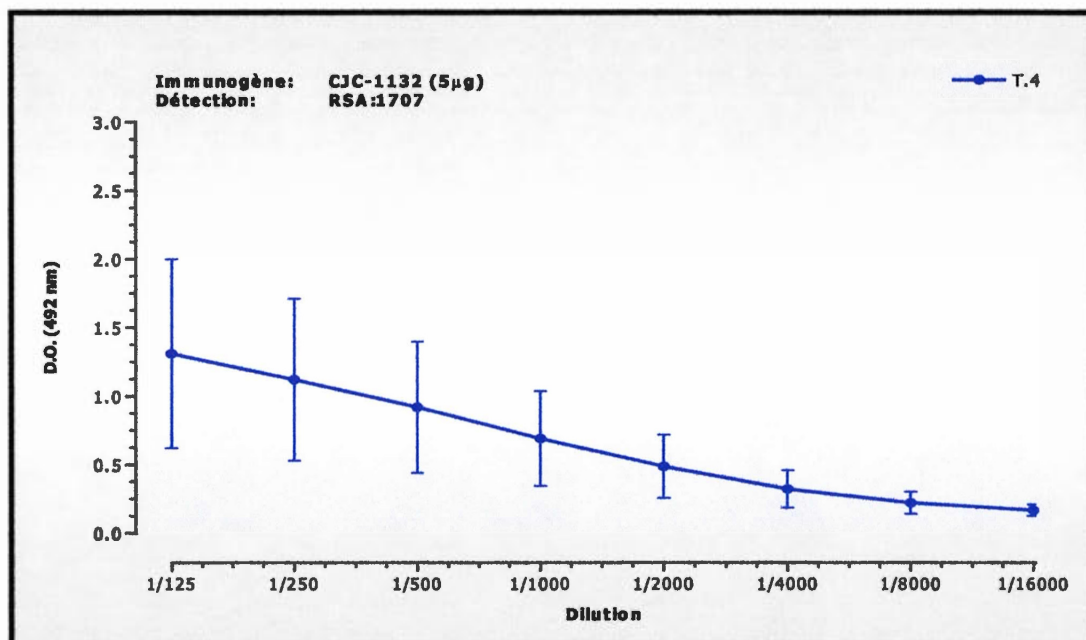


**Figure 3.54** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1707 à une dose de 50 µg lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de CJC-1132 et (B) de RSA:1707. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.



**Figure 3.55** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-170,7 à une dose de 5 µg, lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence (A) de CJC-1132 et (B) de RSA:1707. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.





**Figure 3.56** Évaluation de la réaction croisée des anticorps produits chez les rats Sprague Dawley injectés avec du CJC-1132 à une dose de 5 µg lors de l'étude d'immunogénicité en deuxième phase d'immunisation. La détection a été effectuée en présence de RSA:1707. Le titre d'anticorps a été déterminé par EIA.

## CHAPITRE IV

### CONCLUSION

La conjugaison à l'albumine représente une avenue très intéressante pour plusieurs molécules dont le potentiel biologique ne peut être exploité en raison de leur dégradation trop rapide et de leur manque de stabilité en circulation. L'albumine possède plusieurs propriétés physiologiques qui en font un très bon vecteur pour l'élaboration de molécules thérapeutiques à action prolongée. En premier lieu, cette plate-forme technologique a été mise au point pour permettre la conjugaison *in vivo* grâce à la liaison du DAC™ avec la cystéine 34 de l'albumine une fois celui-ci en circulation. Par la suite, il s'est avéré pertinent de procéder à la conjugaison *in vitro* du DAC™ avec une source d'albumine purifiée pour former un conjugué pré-formé (PC). La caractérisation des PC est très importante afin de s'assurer d'obtenir des produits de la plus grande pureté possible. Le processus de purification, développé et breveté par Conjuchem Inc., permet de séparer facilement le conjugué à l'albumine de l'albumine non conjuguée dans une solution comprenant ces deux molécules. L'analyse par Western Blot (figure 3.2) et par LCMS (figure 3.3 à 3.6) démontre très bien l'efficacité de la purification pour obtenir un conjugué avec très peu d'impureté et ne contenant pratiquement aucune trace d'albumine libre. L'albumine de rat ne provenant pas d'une source commerciale permet une excellente conjugaison tout comme l'albumine humaine préalablement purifiée à l'externe. Ce procédé de purification démontre donc une très grande efficacité pour obtenir des conjugués pré-formés qui pourront être utilisés dans les expérimentations ultérieures dans le cadre de ce projet de recherche.

La conjugaison est basée sur la liaison spécifique de la molécule thérapeutique préalablement modifiée à la cystéine libre en position 34 de l'albumine. La dégradation d'Edman est utilisée pour s'assurer que la liaison du DAC<sup>TM</sup> se situe bien au niveau de la cystéine en position 34. Pour les conjugués de cette étude, les résultats de la dégradation d'Edman ne sont pas rapportés, par contre, cette procédure fait maintenant partie intégrante de la caractérisation de tous les conjugués pré-formés. Une étude antérieure réalisée avec des conjugués insuline à l'albumine humaine, démontre très bien que la liaison du DAC<sup>TM</sup> se situe effectivement sur la cystéine libre de l'albumine (Thibaudeau et *al*, 2005). Dans l'ensemble, la technologie de conjugaison à l'albumine est bien établie au niveau moléculaire quant à la liaison du DAC<sup>TM</sup>, soit *in vivo* ou par conjugaison *in vitro* à une source d'albumine purifiée.

L'activité biologique des molécules DAC<sup>TM</sup> du GLP-1 et de l'exendin-4 a été évaluée dans un modèle animal, soit la souris diabétique (C57BLKS/J-M<sup>+/+</sup>Lepr<sup>db</sup>), qui se rapproche sensiblement de la condition humaine du diabète de type 2. Le test oral de tolérance au glucose permet d'évaluer le potentiel insulinothropique des composés suite à leur injection par voie sous-cutanée. Plusieurs études antérieures ont démontré le potentiel insulinothropique du GLP-1 et de l'exendin-4 ainsi que leur potentiel biologique qui est depuis longtemps bien établi (Drucker, 1998; Edwards et *al*, 2001; Egan, Clocquet et Elahi, 2002; Elahi et *al*, 1994). Le GLP-1 subit une dégradation enzymatique trop rapide en circulation ce qui présente un inconvénient majeur pour son utilisation comme traitement thérapeutique. Il a été démontré que pour obtenir un effet appréciable au niveau thérapeutique, le GLP-1 doit être administré de manière continue par voie sous-cutanée (Larsen et *al*, 2001; Toft-Nielsen, Madsbad et Holst, 1999). L'exendin-4 possède une stabilité accrue en circulation comparativement au GLP-1, ce qui en fait une molécule thérapeutique beaucoup plus intéressante. L'administration de l'exendin-4 une fois par jour à deux fois par jour a démontré un effet significatif sur l'homéostasie du glucose (Egan,

Meneilly et Elahi, 2003). Par l'entremise de la conjugaison à l'albumine, on pourrait en effet prolonger l'activité biologique de ces deux hormones et ainsi réduire la fréquence de l'administration.

Les résultats du test oral de tolérance au glucose lorsque les souris ont été injectées avec l'exendin-4 libre (CJC-1132) ainsi que les deux DAC<sup>TM</sup> (CJC-1133 et CJC-1134) permettent de démontrer que 12 heures et 24 heures suivant l'administration sous-cutanée, il y a encore un effet sur la diminution du taux de glucose sanguin pour les DAC<sup>TM</sup> exendin-4 en comparaison avec le composé libre qui possède une activité seulement jusqu'à 6 heures post-injection. Les DAC<sup>TM</sup> GLP-1 (CJC-1050 et CJC-1051) ont une durée d'action prolongée comparativement au GLP-1 natif, mais ne sont pas aussi efficaces que l'exendin-4 libre après 6 heures suivant l'injection. Il y a seulement le DAC<sup>TM</sup> GLP-1 (CJC-1130) modifié afin de supprimer le site de clivage de la DDP IV qui possède une durée d'action jusqu'à 12 heures, mais non 24 heures suivant l'injection. La conjugaison des DAC<sup>TM</sup> de manière *in vivo* permet donc de prolonger l'action insulinothropique du GLP-1 et de l'exendin-4. Mise à part la dégradation naturelle de l'albumine en circulation, la conjugaison pourrait donc conférer aux molécules thérapeutiques une protection contre la dégradation enzymatique. Comme le GLP-1 est plus rapidement dégradé que l'exendin-4 alors il est normal d'observer ce même rapport de dégradation lorsque les DAC<sup>TM</sup> sont conjugués, puisque quand le site de clivage à la DPP IV est modifié, la stabilité du DAC<sup>TM</sup> GLP-1 est accrue et comme l'exendin-4 n'est pas un substrat de la DPP IV sa stabilité en circulation est encore plus élevée. Selon l'hypothèse de départ de ce projet de recherche et à la lumière de ses résultats, il serait possible d'avancer que l'attachement d'une molécule thérapeutique à l'albumine pourrait en modifier sa conformation en retardant et même en empêchant sa dégradation enzymatique et son élimination de la circulation, mais tout en conservant son affinité au récepteur. La conjugaison à l'albumine améliore donc les propriétés pharmacodynamiques du GLP-1 et de l'exendin-4, mais aussi de plusieurs autres molécules telles l'insuline (Thibaudeau et *al*, 2005), le GRF (*growth hormone*

*releasing-factor*) (Jetté et al, 2005) et l'ANP (*atrial natriuretic peptide*) (Léger et al, 2003).

La conjugaison à l'albumine ne permet pas seulement d'améliorer les propriétés pharmacodynamiques des molécules thérapeutiques, mais permet aussi d'accroître les propriétés pharmacocinétiques des ces dernières. En effet, lorsque les composés DAC™ du GLP-1 et de l'exendin-4 sont injectés chez le rat Sprague Dawley, leur temps de demi-vie en circulation sont grandement prolongés. Le GLP-1 natif ne possède qu'un temps de demi-vie de 2 minutes tandis que les DAC™ (CJC-1050 et CJC-1051) qui vont se conjuguer à l'albumine suite à l'injection demeure beaucoup plus longtemps en circulation avec des temps de demi-vie de 15 heures en moyenne. Comme l'exendin-4 est naturellement plus stable que le GLP-1, il normal de constater que le temps de demi-vie des DAC™ (CJC-1133 et CJC-1134) est aussi plus élevé que leur homologues du GLP-1, soit une moyenne de 22 heures. Il faut cependant tenir compte de la biodisponibilité des deux composés quand il sont injectés par voie sous-cutanée puisque les composés DAC™ GLP-1 ne possèdent qu'une biodisponibilité de 3% versus les composés DAC™ exendin-4 dont la biodisponibilité est de 14% ce qui est une différence appréciable. La dose administrée par voie sous-cutanée est aussi cinq fois plus grande que celle administrée par voie intraveineuse ce qui pourrait expliquer que les temps de demi-vie iv et sc sont semblables en plus du fait que l'injection sous-cutanée permet une absorption plus lente. Cette section du volet pharmacocinétique vient donc appuyer les résultats obtenus en pharmacodynamique lors des OGTT à savoir que la conjugaison des DAC™ à l'albumine de manière *in vivo* permet l'amélioration de leur stabilité en circulation et donc de leur potentiel biologique.

La technologie DAC™ a permis de mettre au point un prolongement naturel à cette plate-forme, soit la technologie des PC-DAC™ qui sont les conjugués pré-formés *in vitro* à partir d'une source d'albumine externe purifiée. Le processus de purification et de caractérisation a été mis au point comme mentionné précédemment

afin d'obtenir un conjugué exempt d'albumine libre, d'une grande pureté et dont pratiquement la totalité du DAC<sup>TM</sup> est liée de façon covalente à la cystéine libre en position 34. Deux sources d'albumine ont été utilisées pour mettre au point les conjugués pré-formés de ce projet de recherche. L'albumine humaine provenant d'une source commerciale purifiée et l'albumine de rat qui a été purifiée à l'interne à partir du plasma de rat Sprague Dawley. Comme l'exendin-4 possède un potentiel biologique plus puissant que le GLP-1 il s'est donc avéré plus intéressant de développer des conjugués à partir de cette molécule. L'étude entreprise pour évaluer le potentiel insulinothérapeutique des conjugués pré-formés du DAC<sup>TM</sup> exendin-4 (CJC-1134) à l'albumine humaine (CJC-1249) et à l'albumine de rat (CJC-1730) n'a pas été élaborée de la même façon que l'étude précédente avec les DAC<sup>TM</sup> seulement. Il a été jugé plus pertinent de ne pas procéder avec un test oral de tolérance au glucose, mais plutôt selon un régime imitant sensiblement une thérapie donc suivant l'administration unique, une fois par jour et à tous les deux jours sans procéder au jeûne préalable des souris diabétiques. Ce type de régime permet une meilleure évaluation de l'effet en temps réel lorsque la consommation d'eau et de nourriture n'est pas limitée. Le profil glycémique obtenu suite à l'injection d'une seule dose d'exendin-4 libre et de ses dérivés démontre clairement que la conjugaison à l'albumine permet de normaliser le taux de glucose sanguin pendant une période de 24 heures qui s'étend jusqu'à 48 heures pour le conjugué à l'albumine humaine. La conjugaison du DAC<sup>TM</sup> *in vivo* ne permet pas de normaliser le taux de glucose sur une aussi longue période de temps. Ces résultats soulèvent donc un point important à savoir que l'efficacité de conjugaison *in vitro* serait supérieure à la conjugaison *in vivo* permettant ainsi d'élaborer des molécules possédant un meilleur pouvoir thérapeutique. L'étude a été poussée plus loin en évaluant l'effet d'un régime d'injections multiples sur la glycémie des souris diabétiques. Sur une période de sept jours, c'est le conjugué à l'albumine humaine injecté à tous les deux jours qui possède un potentiel insulinothérapeutique permettant de normaliser le plus efficacement le taux de glucose sanguin. Le conjugué à l'albumine de rat est aussi très efficace,



mais semble perdre légèrement de son efficacité après une période de 48 heures. Tout comme le conjugué à l'albumine humaine injectée à tous les jours, une légère perte d'activité est aussi observée après 48 heures. Ce phénomène pourrait être attribuable à la destruction de l'albumine humaine par le système immunitaire de la souris qui est sollicité plus activement dû à des injections quotidiennes.

L'exendin-4 possède une action quant au contrôle de la faim et de la soif comme l'ont démontré des études antérieures (Aziz et Anderson, 2003; Talsania et *al*, 2005). La consommation d'eau et de nourriture a été évaluée afin de vérifier si la diminution du taux de glucose reliée à l'injection de l'exendin-4 et de ses dérivés correspondait avec une diminution de la consommation de nourriture. En effet, plus le potentiel insulinothypique est élevé, plus la consommation d'eau et de nourriture diminue. Par contre, on ne peut relier la diminution du taux de glucose sanguin à la diminution de la consommation de nourriture puisque cette dernière augmente graduellement pour atteindre le niveau du groupe contrôle et ce même à la suite d'une injection. Donc même si les souris consomment plus de nourriture à la fin de l'étude comparativement au début, le taux de glucose sanguin n'est pas affecté. L'action de l'exendin-4 est dépendante du glucose donc le récepteur n'est activé que lorsque qu'il y a une augmentation du glucose sanguin, ce qui empêche le stade hypoglycémique donc l'injection à tous les jours n'est pas nécessaire si on peut contrôler le taux de glucose sur une période dépassant 24 heures, ce qui est le cas du conjugué exendin-4 à l'albumine humaine.

Le poids corporel des souris diabétiques a été mesuré tout au long de l'étude. Comme la consommation de nourriture des groupes traités a diminué, il serait donc normal d'observer une diminution du poids corporel des souris. Par contre, la prise de poids progresse comme celle du groupe contrôle à l'exception d'un effet plus marqué lors du régime d'injection multiples pour les conjugués pré-formés, mais la progression redevient similaire au groupe contrôle. Le traitement n'a été effectué que sur une courte période donc il est possible que les effets sur la perte de poids ne soient pas des plus marqués. Des études antérieures chez des patients atteints du diabète de

type 2 démontrent clairement un effet sur la perte de poids suite à un régime d'injection effectué sur plusieurs semaines (Mack *et al*, 2006; Poon *et al*, 2005).

Un volet pharmacocinétique a aussi été élaboré afin d'évaluer la stabilité des conjugués pré-formés chez le rat Sprague Dawley. Malgré les résultats obtenus en pharmacodynamique, c'est le conjugué exendin-4 à l'albumine humaine qui possède le temps de demi-vie le moins élevé, ce phénomène pourrait être expliqué par une élimination plus rapide de l'albumine humaine chez le rat que chez la souris. Ce qui est plutôt inattendu c'est le temps de demi-vie de 34 heures du DAC<sup>TM</sup> exendin-4 injecté par voie sous-cutané. De plus, la biodisponibilité de ce composé est moindre que celle des conjugués pré-formés, mais lorsque l'on observe l'analyse Western Blot des échantillons prélevés chez les rats injectés par voie sous-cutanée avec le DAC<sup>TM</sup> exendin-4, on remarque immédiatement que le composé entre rapidement en circulation pour se conjuguer à l'albumine et que le conjugué est éliminé lentement de la circulation sur une période de 72 heures. Les groupes traités avec les conjugués pré-formés atteignent une concentration maximale en circulation seulement après 24 à 48 heures suivant l'injection sous-cutanée. Les conjugué pré-formés sont donc relargués plus lentement dans le compartiment sanguin lorsqu'ils sont injectés par voie sous-cutanée ce qui permet de rester plus longtemps en circulation donc ce qui expliquerait que l'effet biologique des conjugués pré-formés soit de plus longue durée.

Ces résultats apportent un bon point sur la question de la route d'administration puisque d'un point de vue thérapeutique et pour la compliance du patient, il est plus facile de recourir à l'injection sous-cutanée qu'à l'injection intraveineuse. Comme la voie d'administration sous-cutanée offre l'avantage d'une libération plus lente au site d'injection et que de plus les propriétés de la conjugaison à l'albumine augmentent la stabilité des molécules en circulation, il est donc possible d'obtenir un composé de type «*long lasting*» très efficace. Cela permettrait donc de réduire la fréquence du dosage et éviterait le passage en circulation d'une trop grande concentration de l'agent thérapeutique ce qui se produit lors de l'injection intraveineuse et qui peut par

le fait même provoquer plus d'effets secondaires. Malgré que les études de pharmacocinétiques ont été effectuées avec des doses beaucoup plus élevées lors de l'administration sous-cutanée cela ne signifie pas que le potentiel biologique soit diminué lorsque les composés sont injectés par voie sous-cutanée en comparaison avec la voie intraveineuse. Cependant, il n'y a pas de résultats pour appuyer ce point dans cette étude, mais plusieurs autres études antérieures ont démontrés qu'il n'y avait pas de différence au niveau de l'activité biologique selon que les composés soient injectés par voie sous-cutanée versus par voie intraveineuse (Parisien, 2002).

Un autre point qui peut être observé à travers les résultats de cette recherche, c'est la différence entre l'activité et les propriétés biologiques des composés DAC<sup>TM</sup> versus les PC-DAC<sup>TM</sup>. La conjugaison *in vivo* a été la première étape d'une toute nouvelle plate-forme technologique, mais l'arrivée de la conjugaison *in vitro* est venue renforcée les nombreux avantages de la conjugaison à l'albumine. Les premiers résultats de pharmacodynamique ont démontré clairement l'efficacité de la conjugaison à l'albumine *in vivo* sur l'augmentation de l'activité biologique et la stabilité des composés injectés en circulation. Par contre, l'efficacité des conjugués pré-formés est supérieure ce qui augmente le potentiel thérapeutique des molécules à l'étude et de plusieurs autre molécules qui pourront bénéficier de cette nouvelle approche de la conjugaison à l'albumine. La conjugaison *in vivo* ne permet pas d'obtenir la totalité des molécules conjuguées à l'albumine malgré la liaison rapide en circulation, le DAC<sup>TM</sup> peut se lier à d'autres molécules tels la transferrine et les immunoglobulines même si ce n'est qu'à de faibles proportions. Par contre, la conjugaison à l'albumine *in vitro* permet de s'assurer que le composé injecté est totalement sous la forme d'un complexe peptide-albumine et malgré l'énorme dimension de ce complexe, il n'y a pas de perte d'activité une fois injecté, mais seulement une durée d'action prolongée encore plus intéressante que celle du DAC<sup>TM</sup> seul. Un point qui pourrait demander une plus grande investigation expérimentale serait de savoir ce qui se passe exactement au niveau de la liaison au récepteur puisque comme l'on démontré les résultats des essais de liaison sur les cellules CHO,

les conjugués pré-formés perdent beaucoup d'affinité au récepteur en comparaison au DAC<sup>TM</sup>. Il faut cependant se rappeler que les modèles *in vitro* ne sont pas l'exact représentation de ce qui se passe réellement au niveau *in vivo*.

Plusieurs autres études pourraient être effectuées pour mieux comprendre ce qui se passe au niveau moléculaire quand le conjugué entre en circulation. Pour appuyer l'hypothèse selon laquelle la conjugaison à l'albumine favoriserait un changement de conformation de l'agent actif qui empêcherait sa reconnaissance par les enzymes de dégradation, mais qui lui permet tout de même de se lier à son récepteur pour déclencher la cascade de signalisation. On peut penser à la modélisation moléculaire, pour analyser le niveau de changement conformationnel, les études de Biacore pour analyser les interactions entre le complexe peptide et albumine avec son récepteur (Bazarsuren et *al*, 2002). Il serait aussi intéressant d'approfondir l'action d'un tel complexe sur les voies de signalisation liées à la molécule conjuguée. Ces expérimentations permettraient d'améliorer la technologie et de mieux comprendre la conjugaison afin de mettre au point de meilleurs agents thérapeutiques ainsi que d'être en mesure d'appliquer ce procédé à plusieurs autres molécules dont le pouvoir thérapeutiques pourraient être grandement exploité.

Un point sur lequel il serait important de discuter concerne le volet des études d'immunogénicité. On avance dans ce projet de recherche que non seulement la conjugaison à l'albumine permettrait d'augmenter l'activité biologique et la stabilité des molécules liées, mais qu'elle pourrait aussi réduire le pouvoir immunogène de molécules exogènes, tel l'exendin-4 dans le cas présent. Les essais cliniques chez l'humain ont démontré que l'exenatide (exendin-4 synthétique) pouvait provoquer chez 38% des patients, une faible réaction immunitaire et chez 6% des patients une réaction plus importante pouvant diminuer le pouvoir hypoglycémiant du traitement (Morrow, 2005). Une réaction immunitaire provoquée lors d'un traitement thérapeutique peut diminuer grandement l'efficacité du traitement et à plus long terme provoquer l'apparition d'anticorps neutralisants qui peuvent causer des

dommages sérieux. Plusieurs solutions ont été proposées et testées afin de réduire le potentiel immunogénique de certaines molécules, la conjugaison à l'albumine est une avenue intéressante qui n'est pas vraiment exploitée et qui pourrait s'avérer une solution possédant de multiples intérêts.

La phase thérapeutique de l'étude d'immunogénicité avait comme but d'évaluer l'effet d'un traitement à doses thérapeutiques sur la réponse immunitaire des rats Sprague Dawley. Il n'y a aucune procédure d'immunisation forcée donc le système immunitaire n'est pas sollicité volontairement. L'albumine de rat comparativement à l'albumine humaine n'est pas immunogène chez le rat. L'injection du conjugué exendin-4 à l'albumine de rat (RSA:1134) ne déclenche aucune réponse immunitaire contrairement au conjugué à l'albumine humaine (HSA:1134). Par contre, l'exendin-4 libre injectée seule ne provoque aucune élévation du titre d'anticorps pour la durée entière du traitement. À ce stade, le traitement ne semble pas d'être assez long pour provoquer la formation d'anticorps. Les essais cliniques antérieurs démontraient une réaction immunitaire seulement après 30 semaines de traitement (Morrow, 2005) ce qui est beaucoup plus long que le 28 jours de l'étude. Malgré ces résultats, il est possible d'observer que la réaction croisée des anticorps produits chez les rat injectés avec le conjugué à l'albumine humaine ne sont que très faiblement réactifs en présence d'exendin-4 libre, mais beaucoup plus réactifs en présence du conjugué à l'albumine de rat ce qui pourrait laisser sous-entendre la question concernant le changement de conformation de la molécule native une fois liée à l'albumine. Donc, comme l'albumine de rat n'est pas immunogène, il se pourrait fort bien que l'exendin-4 ne soit pas reconnu par le système immunitaire et que l'albumine agisse comme un bouclier de protection, mais il a fallu pousser l'étude plus loin pour tenter de prouver ce point.

L'étude de première phase d'immunisation sert précisément à stimuler volontairement le système immunitaire afin de provoquer la formation d'anticorps. L'utilisation d'un adjuvant est donc nécessaire et permet de déterminer si le système immunitaire est capable de reconnaître l'exendin-4 comme exogène malgré sa

conjugaison à l'albumine. Donc, même avec une stimulation volontaire du système immunitaire, l'albumine de rat n'est pas immunogène chez le rat comparativement à l'albumine humaine. De plus, comme il était prévisible, l'exendin-4 libre provoque cette fois-ci la formation d'anticorps. Alors pour venir appuyer l'hypothèse de départ, le conjugué exendin-4 à l'albumine de rat ne provoque aucune formation d'anticorps même lorsque le système immunitaire est fortement stimulé. La réaction croisée en présence de toutes les autres molécules confirme qu'il n'y a effectivement aucun anticorps présent. On observe comme précédemment que les anticorps dirigés contre le conjugué à l'albumine humaine ne sont pratiquement pas réactifs face à l'exendin-4 libre, mais que ceux formés suite à l'injection de l'exendin-4 libre réagissent fortement en présence des conjugués. Ceci permet donc de sous-entendre que le système immunitaire va reconnaître surtout l'albumine et non l'exendin-4 qui est liée tandis que les anticorps formés en présence d'exendin-4 vont être capables de reconnaître la molécule même si elle est liée à l'albumine.

La poursuite de l'étude avec la deuxième phase d'immunisation a permis de déterminer si un DAC<sup>TM</sup> exendin-4 venant se lier à l'albumine par la portion N-terminale et non en C-terminale de façon conventionnelle, pourrait induire une réponse immunitaire. La séquence de neuf acides aminés en C-terminale présente pour l'exendin-4 et non pour le GLP-1 pourrait être ce qui cause l'immunogénicité de l'exendin-4. Donc, une fois le DAC<sup>TM</sup> en N-terminal lié à l'albumine, la portion C-terminale est libre et pourrait stimuler une réaction immunitaire. Par contre, il reste à démontrer si la conjugaison à l'albumine protégerait tout de même cette molécule du système immunitaire. Contrairement à la première phase d'immunisation où le conjugué à l'albumine de rat ne déclenchait aucune formation d'anticorps, il y a une réaction immunitaire observable avec le conjugué dont le DAC<sup>TM</sup> est en N-terminal. Par contre, ce ne sont pas tous les rats du groupe qui produisent des anticorps contre ce conjugué. C'est la réaction d'un seul rat en particulier qui est plus prononcée et celle d'un deuxième rat, mais elle n'apparaît qu'après plusieurs injections. Les deux autres rats du groupe ne réagissent pas du tout. Donc le fait d'exposer la partie



immunogène de l'exendin-4 déclenche une réponse immunitaire à un certain degré, mais cela soulève une autre question à savoir si les groupes expérimentaux ne devraient pas être constitués de plus d'animaux, peut-être dix au lieu de quatre. À ce moment là il serait peut-être possible de mieux évaluer la réponse immunitaire. Tout de même, la conjugaison à l'albumine diminue l'immunogénicité du DAC<sup>TM</sup> en N-terminal puisque ce dernier démontre un potentiel immunogène à faible dose en comparaison avec l'exendin-4 libre.

Comme des études antérieures l'ont démontré, la conjugaison à l'albumine diminue significativement le potentiel immunogénique de molécules exogènes au corps humain (Mao et Poznansky, 1989; Wong, Cleland et Poznansky, 1980). Il est évident que cette étude d'immunogénicité était bien préliminaire puisque rien de tel avec l'exendin-4 n'avait été fait auparavant. Par contre, à la lumière des résultats obtenus il semblerait que la conjugaison à l'albumine diminue effectivement l'immunogénicité de l'exendin-4. La conjugaison à l'albumine permettrait donc de créer un bouclier face au système immunitaire en empêchant la reconnaissance de la molécule étrangère. Il faudrait cependant élaborer une étude plus profonde avec des groupes d'animaux plus grands et aussi avec d'autres composés immunogéniques afin de confirmer cette hypothèse.

Finalement, l'ensemble des travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche démontre clairement l'efficacité de la conjugaison à l'albumine afin d'améliorer le profil pharmacodynamique et pharmacocinétique de l'exendin-4 et de ses dérivés. La conjugaison *in vitro* devient donc la meilleure technologie pour obtenir un composé dont l'activité biologique et la stabilité sont augmentées. Cette nouvelle technologie étant mieux comprise et maîtrisée, l'élaboration de nouveaux agents thérapeutiques encore plus efficaces pourra être possible, ce qui est le cas de l'exendin-4 pour le traitement des personnes atteintes du diabète de type 2.

## BIBLIOGRAPHIE

Adair, F. and Ozanne, D. 2002. «The immunogenicity of therapeutic proteins». *BioPharm*, vol. 15, p. 30-36.

Aziz, A., Anderson, G. H. 2003. «Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, interacts with proteins and their products of digestion to suppress food intake in rats». *Journal of Nutrition*, vol. 133, p. 2326-2330.

Bazarsuren, A., Grauschopf, U., Wozny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panzner, S., Rudolph, R. 2002. «In vitro folding, functional characterization, and disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor». *Biophysical Chemistry*, vol. 96, p. 305-318.

Brower, V. 2001. «Proteomics: biology in the post-genomic era. Companies all over the world rush to lead the way in the new post-genomics race». *EMBO*, vol. 2, p. 558-560.

Bullock, B. P., Heller, R. S. et Habener J. F. 1996. «Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor». *Endocrinology*, vol. 137, p. 2968-2978.

Campos, R. V., Lee, Y. C., Drucker, D. J. 1994. «Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse». *Endocrinology*, vol. 134, no 5, p. 2156-2164.

Cerasi, E., Kaiser, N., Lebowitz, G. 2000. «Type 2 diabetes and  $\beta$  cell apoptosis». *Diabetes and Metabolism*, vol. 3, p. 13-16.

Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. 1995. «How MAP kinases are regulated». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, p. 14843-14846.

Davis, R. J. 1995. «Transcriptional regulation by MAP kinases». *Molecular Reproduction and Development*, vol. 42, p. 459-467.

Deacon, C. F., Johnsen, A.H., Holst, J. J. 1995. «Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 80, no 3, p. 952-957.

- Deacon, C. F., Pridal, L., Klarskov, L., Olesen, M., Holst, J. J. 1996. «Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig». *American Journal of Physiology*, vol. 271, p. E458-E464.
- DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C., Ferrannini, E. 1992. «Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview». *Diabetes Care*, vol. 15, no 3, p. 318-368.
- DeFronzo, R. A. 1997. «Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes». *Diabetes*, vol. 5, p. 117-269.
- DeFronzo, R. A. 2000. «Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus». *Annals of Internal Medicine*, vol. 133, p. 73-74.
- DeFronzo, R. A. 2004. «Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus». *The Medical clinics of North America*, vol. 88, no 4, p. 787-835.
- Delgado, E., Luque, M. A., Alcantara, A., Trapote, M. A., Clemente, F., Galera, C., Valverde, I., Villanueva-Penacarrillo, M. L. 1995. «Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle». *Peptides*, vol. 16, no 2, p. 225-229.
- Dhanvantari, S., Seidah, N. G., Brubaker, P. L. 1996. «Role of prohormone convertase in the tissue-specific processing of proglucagon». *Molecular Endocrinology*, vol. 10, no 4, p. 342-355.
- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., Habener, J. F. 1987. «Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increase cyclic AMP levels in a rat islet cell line». *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 84, p. 3434- 3438.
- Drucker, D. J. 1998. «Glucagon-like peptides». *Diabetes*, vol. 47, no 2. p. 159-169.
- Earl, M. A. 2005. «Emerging therapies in the treatment of type 2 diabetes». *Pharmacotherapy update*, vol. 8, no 1.
- Edwards, C., Stanley, S., Davis, R., Brynes, A., Frost, G., Seal, L., Ghatei, M., Bloom, S. 2001. «Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 281, p. E155-E161.
- Egan, J. M., Meneilly, G. S., Elahi, D. 2002. « Effect of one month bolus subcutaneous administration of exendin-4 in type 2 diabetes». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 284, p. E1072-1079.

- Egan, J.M., Clocquet, A. R., Elahi, D. 2002. «The insulintropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 87, no 3. p. 1282-1290.
- Egan, J. M., Bulotta, A., Hui, H., Perfetti, R. 2003. «GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells». *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, vol. 19, p. 115-123.
- Egan, J. M., Meneilly, G. S., Elahi, D. 2002. «Effect of one month bolus subcutaneous administration of exendin-4 in type 2 diabetes». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 284, p. E1072-E1079.
- Elahi, D., McAloon-Dyke, M., Fukagawa, N. K., Meneilly, G. S., Sclater, A. L., Minaker, K. L., Habener, J. F., Andersen, D. K. 1994. «The insulintropic actions of glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects». *Regulatory Peptides*, vol. 51, p. 63-74.
- Eng, J., Andrews, P. C., Kleinman, W. A., Singh, L., Raufman, J. P. 1990. «Purification and structure of exendin-3, a new pancreatic secretagogue isolated from *Heloderma horridum* venom». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no 33, p. 20259-20262.
- Eng, J., Kleinman, W. A., Singh, L., Singh, G., Raufman, J. P. 1992. «Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no 11, p. 7402-7405.
- Evans, A. J., Krentz, A. J. 1999. «Recent developments and emerging therapies for type 2 diabetes mellitus». *Drugs R. D.*, vol. 2, no 2, p. 75-94.
- Evans, J. L., Rushakoff, R. J. 2002. «Oral pharmacological agents for type 2 diabetes: sulfonylureas, meglitinides, metformin, thiazolidinediones,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, and emerging approaches». *Endotext.com*, chapter 14.
- Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., DiMario, U., Perfetti, R. 2002. «Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats». *Endocrinology*, vol. 143, p. 4397-4408.

- Fehmann, H. C., Habener, J. F. 1991. «Functional receptors for the insulinotropic hormone GLP-1(7-37) on a somatostatin secreting cell line». *FEBS Letters*, vol. 279, p. 335.
- Fehmann, H. C., Habener, J. F. 1992. «Insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in  $\beta$ TC-1 insulinoma cells». *Endocrinology*, vol. 130, p. 159-166.
- Gerich, J. E. 1998. «The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion *versus* impaired insulin sensitivity». *Endocrine reviews*, vol. 19, no 4, p. 491-503.
- Gromada, J. et Rorsman, P. 1996. «Molecular mechanism underlying glucagon-like peptide 1 induced calcium mobilization from internal stores in insulin-secreting beta TC3 cells». *Acta. Physiologica Scandinavica*, vol. 157, no 3, p. 349-351.
- Gutzwiller, J. P., Drewe, J., Goke, B., Schmidt, H., Rohrer, B., Lareida, J., Beglinger, C. 1999. «Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2». *American Journal of Physiology*, vol. 276, no 5, p. R1541-1544.
- Hattersley, A. T. 2006. «Beyond the beta cell in diabetes». *Nature Genetics*, vol. 38, no 1, p. 12-13.
- Heller, R. S., Kieffer, T. J. et Habener, J. F. 1997. «Insulinotropic glucagon-like peptide 1 receptor expression in glucagon-producing  $\alpha$ -cells of the rat endocrine pancreas». *Diabetes*, vol. 46, p. 785-791.
- Holst, J. J., Orskov, C., Van Nielsen, O., Schwartz, T. W. 1987. «Truncated glucagons-like peptide I, an insulin releasing hormone from the distal gut». *FEBS Letters*, vol. 211, p. 160-173.
- Holz, G. G., Kuhtreiber, W. M., Habener, J. F. 1992. «Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1(7-37) ». *Nature*, vol. 361, p. 362-365.
- Hui, H., Wright, C., Perfetti, R. 2001. «Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells». *Diabetes*, vol. 50, p. 785-796.

- Hui, H., Nourparvar, A., Zhao, X., Perfetti, R. 2003. «Glucagon-like peptide 1 inhibits apoptosis of insulin secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway». *Endocrinology*, vol. 144, no 4, p. 1444-1455.
- Hupe-Sodmann, K., Goke, R., Goke, B., Thole, H. H., Zimmermann, B., Voigt, K., McGregor, G. P. 1997. «Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1 (7-36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells». *Peptides*, vol. 18, no 5, p. 625-632.
- Hussain, M. A., Habener, J. F. 2000. «Glucagon-like peptide 1 increases glucose-dependent activity of the homeoprotein IDX-1 transactivating domain in pancreatic beta-cells». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 274, no 3, p. 616- 619.
- International Diabetes Federation: diabetes prevalence at [www.idf.org](http://www.idf.org)
- Jetté, L., Léger, R., Thibaudeau, K., Benquet, C., Robitaille, M., Pellerin, I., Paradis, V., van Wyk, P., Pham, K., Bridon, D. P. 2005. «Human growth hormone-releasing factor (hGRF)1-29-albumin bioconjugates activate the GRF receptor on the anterior pituitary in rats: identification of CJC-1295 as a long-lasting GRF analog». *Endocrinology*, vol. 146, no 7, p. 3052-3058.
- Kawai, K., Suzuki, S., Ohashi, S., Mukai, H., Ohmori, H., Murayama, Y., Yamashita, K. 1989. «Comparaison of the effects of GLP-1(1-37) and (7-37) and glucagon on islet hormone release from the isolated perfused canine and rat pancreas». *Endocrinology*, vol. 124, p. 1768-1773.
- Kieffer, T. J., McIntosh, C. H., Pederson, R. A. 1995. «Degradation of glucose-dependent insulintropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV». *Endocrinology*, vol. 136, no 8, p. 3585-3596.
- Kieffer, T. J., Habener, J. F. 1999. «The glucagon-like peptides». *Endocrine Reviews*, vol. 20, no 6, p. 876-913.
- King, H., Aubert, R. E., Herman, W. H. 1998. «Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections». *Diabetes Care*, vol. 21, p. 1414-1431.
- Klingbeil, C. And Hsu, D. H. 1999. «Pharmacology and safety assessment of humanized monoclonal antibodies for therapeutic use». *Toxicology and Pathology*, vol. 27, p. 1-3.



- Knudsen, L. B. et Pridal, L. 1996. «Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor». *European Journal of Pharmacology*, vol. 318, p. 429-435.
- Knudsen, L. B. 2004. «Glucagon-like peptide-1: the basis for a new class of Treatment for type 2 diabetes». *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 47, p. 4128-4134.
- Kolkman, J. A. and Stemmer, W. P. 2001. «Directed evolution of proteins by exon shuffling». *National Biotechnologies*, vol. 19, p. 423-428.
- Kreymann, B., Ghatel, M. A., Williams, G., Bloom, S. R. 1987. «Glucagon-like peptide-1(7-36): a physiological incretin in man». *Lancet*, vol. 2, p. 1300-1304.
- Kreymann, B., Ghatel, M. A., Burnet, P., Williams, G., Kanse, S., Diani, A. R., Bloom, S.R. 1989. «Characterization of glucagon-like peptide-1(7-36) amide in the hypothalamus». *Brain Research*, vol. 502, p. 325-331.
- Larsen, J., Hylleberg, B., Ng, K., Damsbo, P. 2001. «Glucagon-like peptide-1 infusion must be maintained for 24 hours/day to obtain acceptable glycemia in type 2 diabetic patients who are poorly controlled on sulphonylurea treatment». *Diabetes Care*, vol. 24, no 8, p. 1416-1421.
- Léger, R., Robitaille, M., Quraishi, O., Denholm, E., Benquet, C., Carette, J., van Wyk, P., Pellerin, I., Bousquet-Gagnon, N., Castaigne, J.-P., Bridon, D. P. 2003. «Synthesis and in vitro analysis of atrial natriuretic peptide-albumin conjugates». *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 13, p. 3571-3575.
- Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Grémeaux, T., Gonzalez, T., Barrès, R., Tanti, J. 2003. «Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling». *Biochemical Society Transactions*, vol. 31, p. 1152-1156.
- LeRoith, D., Zick, Y. «Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance». 2001. *Diabetes Care*, vol. 24, no 3 , p. 588-597.
- Lodish, H., Berk, A., Zipurski, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2000. *Molecular cell biology*, 4<sup>th</sup> edition. W.H. Freeman, 1184 p.

- Lu, M., Wheeler, M. B., Leng, X. H., Boyd, A. E. 1993. «The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1(7-37)». *Endocrinology*, vol. 132, no1, p. 94-100.
- Mack, C. M., Moore, C. X., Jodka, C. M., Bhavsar, S., Wilson, J. K., Roan, J. L., Vu, C., Laugero, K. D., Parkes, D. G., Young, A. A. 2006. «Antiobesity action of peripheral exenatide (exendin-4) in rodents: effects on food intake, body weight, metabolic status and side-effect measures». *International Journal of Obesity*, [sous presse].
- Mao, G. D. and Poznansky, M.J. 1989. «Superoxide dismutase: improving its pharmacological properties by conjugation with human serum albumin». *Biomaterials, Artificial Cells and Artificial Organs*, vol. 17, no 3, p. 229-244.
- Marcovecchio, M., Mohn, A., Chiarelli, F. 2005. «Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents». *Journal of Endocrinal Investigation*, vol. 28, no 9, p. 853-863.
- Mentlein, R., Gallwitz, B., Schmidt, W. E. 1993. «Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum». *European Journal of Biochemistry*, vol. 214, no 3, p. 829-835.
- Miki, H., Namba, M., Nishimura, T., Mineo, I., Matsumura, T., Miyagawa, J., Nakajima, H., Kuwajima, M., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y. 1996. «Glucagon-like peptide-1(7-36) amide enhances insulin-stimulated glucose uptake and decreases intracellular cAMP content in isolated rat adipocytes». *Biochimica and Biophysica Acta.*, vol. 1312, p. 132-136.
- Mojsov, S., Heinrich, G., Wilson, I. B., Ravalozza, M., Orci, L. 1986. «Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, p. 11880-11889.
- Mojsov, S., Weir, G. C., Habener, J. F. 1987. «Insulinotropin:glucagon-like peptide-I(7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas». *Journal of Clinical Investigations*, vol. 79, p. 616-619.
- Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B.A., Dietz, W.H., Vinicor, F., Bales, V.S., Marks, J.S. 2001. «Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related risk factors». *Journal of the American Medical Association*, vol. 289, no 1, p. 76-79.

- Montrose-Rafizadeh, C., Yang, H., Rodgers, B. D., Beday, A., Pritchette, L. A., Eng, J. 1997. «High potency antagonists of the pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 34, p. 21201-21206.
- Montrose-Rafizadeh, C., Avdonin, P., Garant, M. J., Rodgers, B. D., Kole, S., Yang, H., Levine, M. A., Schwindinger, W., Bernier, M. 1999. «Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in chinese hamster ovary cells». *Endocrinology*, vol. 140, no 3, p. 1132-1140.
- Morales M., Lopez-Delgado, M. I., Alcantara, A., Luque, M. A., Clemente, F., Marquez, L., Puente, J., Vinambres, C., Malaisse, W. J., Villanueva-Penacarrillo, M. L., Valverde, I. 1994. «Preserved GLP-I effects on glycogen synthase  $\alpha$  activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats». *Diabetes*, vol. 46, no. 8, p.1264-1269.
- Narayan, K. M., Boyle, J. P., Thompson, T. J., Sorensen, S. W., Williamson, D. F. 2003. «Lifetime risk for diabetes mellitus in the Unites States». *Journal of American Medical Association*, vol. 290, no 1, p. 1884-1890.
- Nauck, M. A., Niedereichholz, U., Ettler, R., Holst, J. J., Orskov C., Ritzel, R., Schmiegel, W. H. 1997a. «Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans». *American Journal of Physiology*, vol. 273, p. E981-E988.
- Nauk, M. A., Holst, J. J., Willms, B. 1997b. «Glucagon-like peptide 1 and its potential in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus». *Hormone Metabolic Research*, vol 29, no 9, p. 411-416.
- Nishizawa, M., Nakabayashi, H., Kawai, K., Ito, T., Kawakami, S., Nakagawa, A., Nijjima, A., Uchida, K. 2000. «The hepatic vagal reception of intraportal GLP-1 is via receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor». *Journal of the Autonomic Nervous System*, vol. 80, p. 14-21.
- Orskov, C., Andreasen, J., Holst, J. J. 1992. «All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 74, no 2, p. 379-384.
- Parisien, M. 2002. «Étude de structure/activité de plusieurs analogues du GLP-1». Mémoire de maîtrise, Montréal, Université du Québec à Montréal, 86 p.

- Parkes, D., Jodka, C., Smith, P., Nayak, S., Rinehart, L., Gingerich, R., Chen, K., Young, A. 2001. «Pharmacokinetic actions of exendin-4 in the rat: comparison with glucagon-like peptide-1». *Drug Development Research*, vol. 53, p. 260–267.
- Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H., Pederson, R. A., Demuth, H. U. 1996. «Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no 38, p. 23222-23229.
- Perea, A., Vinambres, C., Clemente, F., Villanueva-Penacarrillo, M. L. et Valverde, I. 1997. «GLP-1(7-36)amide: effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue». *Hormone Metabolic Research*, vol. 29, p. 417-421.
- Perfetti, R., Brown T.A., Velikina, R., Busselen, S. 1999. «Control of glucose homeostasis by incretin hormones». *Diabetes Technology and Therapeutics*, vol. 1, no 3, p. 297-305.
- Peters, T. 1996. «All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications». Academic Press Inc., 432 p.
- Poitout, V., Robertson, P. R. 2002. «Minireview : Secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes - a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity». *Endocrinology*, vol. 143, no 2, p. 339-342.
- Poon, T., Nelson, P., Shen, L., Mihn, M., Taylor, K., Fineman, M., Kim, D. 2005. «Exenatide improves glycemic control and reduces body weight in subjects with type 2 diabetes: a dose-ranging study». *Diabetes Technology and Therapeutics*, vol. 7, no 3, p. 467-477.
- Porte, D., et Kahn, S. E. 2001. « $\beta$ -cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms». *Diabetes*, vol. 50, suppl. 1, p. S160-S163.
- Porter, S. 2001. «Human immune response to recombinant human proteins». *Journal of Pharmacological Science*, vol. 90, p. 1-11.
- Raeder, H., Johansson, S., Holm, P. I., Haldorsen, I. S., Mas, E., Sbarra, V., Nermoen, I., Eide, S. A., Grevle, L., Bjorkhaug, L., Sagen, J. V., Aksnes, L., Sovik, O., Lombardo, D., Molven, A., Njolstad, P. R. 2006. «Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction». *Nature Genetics*, vol. 38, no 1, p. 54-62.

- Raufman, J. P. 1996. «Bioactive peptides from lizard venoms». *Regulatory Peptides*, vol. 61, no 1, p. 1-18.
- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Poitout, V. 2004. «Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes». *Diabetes*, vol. 53, suppl. 1, p. S119-S124.
- Ruiz-Grande, C., Alarcon, C., Merida, E., Valverde, I. 1992. «Lipolytic actions of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes». *Peptides*, vol. 13, p.13-16.
- Schellekens, M. 2002. «Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects». *Clinical Therapeutics*, vol. 24, no 11, p. 1720-1740.
- Schellekens, M. 2003. «Immunogenicity of therapeutic proteins». *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 18, p. 1257-1259.
- Schellekens, M. 2005. «Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins». *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 20, p. vi3-vi9.
- Shiffman, M. L. 2001. «Pegylated interferons: What role will they play in the treatment of chronic hepatitis C». *Current Gastroenterology Reports*, vol. 3, p. 30-37.
- Shimizu, I., Hirota, M., Ohboshi, C., Shima, K. 1987. «Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain». *Endocrinology*, vol. 121, p. 1076-1082.
- Silvestre, R. A., Rodriguez-Gallardo, J., Egido, E. M., Marco, J. 2003. «Interrelationship among insulin, glucagon and somatostatine secretory responses to exendin-4 in the perfused rat pancreas». *European Journal of Pharmacology*, vol. 469, p. 195-200.
- Simonsen, L., Holst, J. J., Deacon, C. F. 2006. «Exendin-4 but not glucagon-like peptide-1, is cleared exclusively by glomerular filtration in anesthetised pigs». *Diabetologia*, vol. 49, no 4, p. 706-712.
- Stoffers, D. A., Desai, B. M., DeLeon, D. D., Simmons, R.A. 2003. «Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat». *Diabetes*, vol. 52, p. 734-740.

- Talsania, T., Anini, Y., Siu, S., Drucker, D. J., Brubaker, P. L. 2005. «Peripheral exendin-4 and peptide YY(3-36) synergistically reduce food intake through different mechanisms in mice». *Endocrinology*, vol. 146, no 9, p. 3748-3756.
- Tang-Christensen, M., Vrang, N., Larsen, P. J. 2001. «Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour». *International journal of obesity and related metabolic disorders*, vol. 25, p. 42-47.
- Thibaudeau, K., Leger, R., Huang, X., Robitaille, M., Quraishi, O., Soucy, C., Bousquet-Gagnon, N., van Wyk, P., Paradis, V., Castaigne, J. P., Brison, D. 2005. «Synthesis and evaluation of insulin-human serum albumin conjugates». *Bioconjugate Chemistry*, vol. 16, no 4, p. 1000-1008.
- Thorens, B. 1992. «Expression cloning of pancreatic beta cell receptor for the glucocretin hormone glucagon-like peptide 1». *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 89, p. 8641-864.
- Thorens, B., Porret, A., Buhler, L., Deng, S-P., Morel, P., Widmann, C. 1993. «Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor». *Diabetes*, vol. 42, no 11, p. 1678-1682.
- Thum, A., Hupe-Sodmann, K., Goke, R., Voigt, K., Goke, B., McGregor, G. P. 2002. «Endoproteolysis by isolated membrane peptidases reveal metabolic stability of glucagon-like peptide-1 analogs, exendins-3 and -4». *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, vol. 110, no 3, p. 113-118.
- Todd, J. F., Wilding, J. P., Edwards, C. M., Khan, F. A., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. 1997. «Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a trial of treatment in non-insulindependent diabetes mellitus». *European Journal of Clinical Investigations*, vol. 27, no 6, p. 533-536.
- Toft-Nielsen, M. B., Madsbad, S., Holst, J. J. 1999. «Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in tpe 2 diabetic patients». *Diabetes Care*, vol. 22, no 7, p. 1137-1143.
- Tourrel, C., Bailbe, D., Lacorne, M., Meile, M. J., Kergoat, M., Portha, B. 2002. «Persistent improvement of type 2 diabetes in the got-kakizaki rat model by expansion of the  $\beta$ -cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4». *Diabetes*, vol. 51, p. 1443-1452.



- Turton, D. D., O'Shea, D., Gunn, J., Beak, S. A., Edwards, C. M., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., Wilding, J. P., Smith, D. M., Ghatei, M. A., Herbert, J., Bloom, S. R. 1996. «A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding». *Nature*, vol. 379, p. 69-72.
- Valverde, I., Merida, E., Delgado, E., Trapote, M. A., Villanueva-Penacarrillo, M. L. 1993. «Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36) amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue». *Endocrinology*, vol. 32, no 1, p. 75-79.
- Valverde, I., Morales, M., Clemente, F., Lopez-Delgado, M. I., Delgado, E., Perea, A., Villanueva-Penacarrillo, M. L. 1994. «Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone». *FEBS Letters*, vol. 349, p. 313-316.
- Van Eyll, B., Lankat-Buttgereit, B., Bode, H. P., Goke, R., Goke, B. 1994. «Signal transduction of the GLP-1-receptor cloned from a human insulinoma». *FEBS Letters*, vol. 348, no1, p. 7-13.
- Villanueva-Penacarrillo, M. L., Alcantara, A. I., Clemente F, Delgado, E., Valverde, I. 1994. «Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> in rat skeletal muscle». *Diabetologia*, vol. 37, p. 1163-1166.
- Wan, M., Wang, Y., Rabideau, S., Moreadith, R., Schrimsher, J., Conn, G. 2002. «An enzyme-linked immunosorbent assay for host cell protein contaminants in recombinant PEGylated staphylokinase mutant SY161». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 28, p. 953-963.
- Wettergren, A., Wojdemann, M., Meisner, S., Stadil, F., Holst, J. J. 1997. «The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in human depends on an intact vagal innervation». *Gut*, vol. 40, p. 597-601.
- Wheeler, M. B., Gelling, R. W., McIntosh, C. H., Georgiou, J., Brown, J. C., Pederson, R. A. 1995. «Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties». *Endocrinology*, vol. 136, no 10, p. 4629-4639.
- Widmann, C., Dolci, W., Thorens, B. 1997. «Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend on phosphorylation of the receptor carboxyl tail at the same three sites». *Molecular Endocrinology*, vol. 11, no 8, p. 1094-1102.

- Willms, B., Werner, J., Holst, J. J., Orskov, C., Creutzfeldt, W., Nauck, M. A. 1996. «Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 81, p. 327-332.
- Wong, K., Cleland, L. G., Poznansky, M. J. 1980. «Enhanced anti-inflammatory effect and reduced immunogenicity of bovine liver superoxide dismutase by conjugation with homologous albumin». *Agents Actions*, vol. 10 no 3, p. 231-239.
- Wright, E., Scism-Bacon, J. L., Glass, L. C. 2006. «Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia». *International Journal of Clinical Practice*, vol. 60, no 3, p. 308-314.
- Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F., Bonner-Weir, S. 1999. «Exendin-4 stimulates both  $\beta$ -cells replication and neogenesis, resulting in increased  $\beta$ -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats». *Diabetes*, vol. 48, p. 2270-2276.
- Yamauchi, J., Nagao, M., Kaziyo, Y., Itoh, H. 1997. «Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of G $\beta\gamma$  and G $\alpha_q/11$  subunits». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, p. 27771-27777.
- Zander, M., Madsbad, S., Madsen, J. L., Holst, J. J. 2002. «Effect of 6-week course of glucagons-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study». *Lancet*, vol. 359, p. 824-830.
- Zhang, S., Liu, J., Dragunow, M., Cooper, G. J. 2003. «Fibrillogenic amylin evokes islet beta-cell apoptosis through linked activation of a capase cascade and JNK1». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no 52, p. 52810-52819.